

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Disoluce z mikrovláknenných nosičů 1.**  
**Dissolution from microfibre carriers 1.**

Markéta Hofmanová

2014

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické technologie**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Disoluce z mikrovláknenných nosičů 1.**  
**Dissolution from microfibre carriers 1.**

Autor: Markéta Hofmanová  
Obor: Farmacie  
Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.  
Hradec Králové

2014

### **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“.

V Hradci Králové dne .....

.....

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce paní doc. PharmDr. Zdeňce Šklubalové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných připomínek a rad, ochotu, trvalý zájem a podporu při vypracování diplomové práce. Také moc děkuji paní Janě Fendrichové za pomoc při realizaci experimentálních prací.

# Obsah

1	Abstrakt.....	7
2	Abstract.....	8
3	Zadání .....	9
4	Seznam symbolů a zkratk .....	10
5	Úvod.....	11
6	Teoretická část .....	12
6.1	Disoluce.....	12
6.1.1	Zkouška disoluce pevných lékových forem.....	13
6.1.2	Zkouška disoluce transdermálních náplastí .....	18
6.1.3	Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum .....	19
6.1.4	Zkouška disoluce lipofilních tuhých léčivých přípravků.....	20
6.1.5	Pravá disoluce .....	21
6.1.6	Zdánlivá disoluce .....	22
6.2	Kyselina hyaluronová.....	23
6.3	Hyaluronová mikrovlákná.....	24
6.4	Dip-coating .....	26
6.5	Dexamethason-fosfát sodná sůl.....	28
7	Experimentální část.....	30
7.1	Použité suroviny.....	30
7.2	Použité přístroje .....	30
7.3	Použité metody.....	31
7.3.1	Příprava izotonického fosfátového pufru (IPB).....	31
7.3.2	Příprava kalibračních roztoků.....	31
7.3.3	Měření absorbance .....	31
7.3.4	Disoluční test .....	32
7.3.5	Zpracování výsledků.....	35
8	Výsledky .....	36
9	Diskuse.....	53

9.1	Stacionární disoluce .....	56
9.2	Otevřená průtoková disoluce.....	58
10	Závěry .....	60
11	Použitá literatura .....	61

# 1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Posluchač: Markéta Hofmanová

Název diplomové práce: Disoluce z mikrovláknenných nosičů 1.

Cílem této diplomové práce bylo studium vlivu podmínek disoluce na uvolňování modelového léčiva z mikrovláknenných nosičů. Bylo použito mikrovlákneno z modifikovaného hyaluronanu, na které bylo v povrchové vrstvě nanášeno léčivo, dexamethason – fosfát. Léčivo bylo uvolňováno přímo z mikrovláknena a/nebo z mikrovláknena uzavřeného do dialyzační membrány do vody a/nebo izotonického fosfátového pufru jako média s použitím metody stacionární a/nebo otevřené průtokové disoluce. Při stacionární disoluci bez dialyzační membrány byl zjištěn významný rozdíl mezi použitými disolučními médii a šaržemi vlákna ( $p \geq 0,99$ ). Ostatní použité metody disoluce vyžadují další standardizaci podmínek.

## 2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Consultant: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Student: Markéta Hofmanová

Title of Thesis: Dissolution from microfibre carriers 1.

The aim of Diploma Thesis was to study of the effect of conditions of dissolution on the release of a model drug from microfibre carriers. A modified hyaluronan microfiber covered with the drug, dexamethasoni natrii phosphas, was used as a carrier. The drug was directly released from the microfibrés and/or from the microfibre enclosed in a dialysis membráně into water and/or the isotonic phosphate buffer medium, respectively, by using stationary and/or open-flow-dissolution method. In the stationary dissolution without dialysis membrane, the significant effect ( $p \geq 0,99$ ) of the used dissolution medium and the batches of fibres were observed. Other used methods of dissolution require further standardization of conditions.



### **3 Zadání**

Cílem diplomové práce je v teoretické části zpracovat přehled požadavků na standardní lékopisné disoluční metody používané k hodnocení uvolňování léčiv z tuhých lékových forem. S ohledem na zaměření experimentální části je cílem také přehled základních informací o vlákenných nosičích pro léčiva.

V experimentální části je úkolem vypracovat metodiku pro hodnocení uvolňování léčiva u mikrovlákného nosiče na bázi derivátu hyaluronanu. Budou studovány podmínky a průběh stacionární a průtokové otevřené disoluce ve dvou vybraných médiích.

## 4 Seznam symbolů a zkratek

<b>A</b>		absorbance
<b>A<sub>k</sub></b>		kumulativní absorbance
<b>c</b>	(μg/ml)	koncentrace
<b>c<sub>diff</sub></b>	(μg/ml)	diferenciální (aktuální) koncentrace
<b>c<sub>k</sub></b>	(μg/ml)	kumulativní koncentrace
<b>ČL</b>		Český lékopis
<b>Da</b>		Dalton
<b>DM</b>		dialyzační membrána
<b>DXF</b>		dexamethason - fosfát sodná sůl
<b>HA</b>		hyaluronová kyselina (hyaluronic acid)
<b>IPB</b>		izotonický fosfátový pufr (isotonic phosphate buffer)
<b>LL</b>		léčivá látka/léčivé látky

## 5 Úvod

Disoluční metody mají důležitou roli při vývoji nových lékových forem, kdy je s jejich pomocí možné simulovat předpokládané podmínky, kterým bude vyvíjený léčivý přípravek vystaven při plnění svého terapeutického či jiného efektu. Snahy o vývoj dalších přípravků jsou výrazně usnadněny použitím disolučních testů, na základě jejichž výsledků si lze představit chování léčivého přípravku v organismu a při případných nevyhovujících závěrech (např. příliš rychlé, příliš pomalé nebo nedostačující uvolnění léčiva, interference léčiva s použitým nosičem) provést různé úpravy či změny např. v uchycení léčiva na daný nosič nebo ve složení nosiče.

Mikrovláknenné nosiče jsou v medicíně využívány zejména pro výrobu přípravků na hojení jak externích, tak i interních ran, jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv, jako separační a antiadhezivní materiály a vstřebatelné sítětky.<sup>1</sup> Tato diplomová práce se zabývá vývojem metodiky pro disoluci modelového léčiva, kterým je dexamethason-fosfát, z hyaluronového mikrovláknna. Jedná se o prvotní studii, která v budoucnu vyžaduje další upřesnění.

## 6 Teoretická část

### 6.1 Disoluce

Disoluce je zkušební postup prováděný pro testování různých lékových forem a má ve farmaceutickém průmyslu obrovský význam, který je zřejmý jednak při vývoji léčiv a jejich zpracování do nově vyvíjených lékových forem, tak v kontrole kvality. Ve farmacii je *in vitro* disoluce prováděna v počátečním testování přípravku k detekci vlivu variabilit vzniklých během výrobního procesu a tím napomáhá výběru nejvhodnější formulace léčivého přípravku.<sup>2,3</sup>

Použití disoluce může urychlit formulování finálního složení léčivého přípravku a umožní okamžité rozpoznání potenciálních problémů s uvolňováním léčiva.<sup>4</sup>

Ačkoliv bylo disoluční testování zprvu vyvinuto pro perorální lékové formy s okamžitým uvolňováním, následně bylo použití rozšířeno i na testování pevných lékových forem s modifikovaným uvolňováním. V současnosti je však disoluční testování využíváno pro další lékové formy jako jsou suspenze, žvýkácí tablety, žvýkácí gummy, transdermální náplasti, polotuhé topické přípravky (krémy, masti a gely), čípky, implantáty a liposomy. Kvůli významným rozdílům ve formulaci těchto nových/speciálních lékových forem není možné navrhnout jednotný testovací systém, který by byl použitelný ke studiu uvolňování ze všech lékových forem. Proto musí být metoda specifická pro jednotlivé lékové formy nebo produkty.<sup>5</sup>

Vzhledem k rozdílným charakteristikám nových/speciálních lékových forem a jejich různému místu a způsobu aplikace vyžadují jednotlivé metody různě modifikované aparatury. Metody pro různé lékové formy se též liší složením disolučního média, které ovšem musí být pro danou metodu jasně specifikované, rychlostí průtoku média a jeho teplotou.<sup>6</sup> Metoda musí garantovat správnost, přesnost a reprodukovatelnost.<sup>5</sup>

Důležité je správné vyhodnocení a interpretace výsledků. v průběhu disoluce se vzorky sbírají jako jednotlivé frakce. Při vyhodnocování se výsledky mohou vyjádřit diferenciální křivkou. Prvním krokem k výpočtu celkové koncentrace uvolněného léčiva je vypočtení koncentrace každého jednotlivého vzorku, tj. diferenciální (aktuální) koncentrace, jejichž postupným sčítáním dostaneme hodnoty

kumulativních koncentrací. Výsledkem sečtení diferenciálních koncentrací všech frakcí je celková koncentrace uvolněného léčiva.<sup>7</sup>

Současně platný Český lékopis uvádí a specifikuje Zkoušku disoluce pevných lékových forem, Zkoušku disoluce transdermálních náplastí, Zkoušku disoluce lipofilních tuhých lékových forem, Zkoušku disoluce léčivých žvýkacích gum, Pravou disoluci a Zdánlivou disoluci.

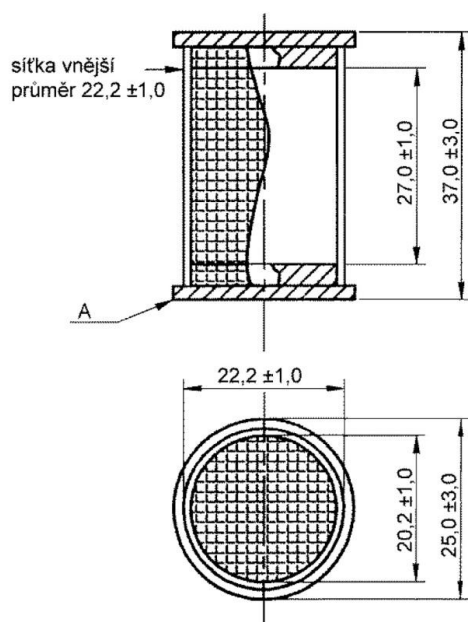
### **6.1.1 Zkouška disoluce pevných lékových forem**

Zkouška disoluce pevných lékových forem patří mezi kontrolní metody farmaceutické technologie a používá se pro pevné lékové formy s běžným uvolňováním, s prodlouženým uvolňováním a se zpožděným uvolňováním k perorálnímu podání. V ČL je uvedena v kapitole 2.9.3. Pro praktické provedení této zkoušky je možné použít 4 typy přístrojů: s košíčkem, s pádlem, s vratným válcem a s průtokovou celou. Jednotlivé přístroje jsou popsány v textu níže. Vyhodnocení, zda přípravek vyhovuje zkoušce, umožňují lékopisem stanovená 3 stupňová kritéria přijatelnosti.<sup>8</sup>

#### **Přístroj s košíčkem**

Zařízení se skládá z nádoby, která je vyrobena ze skla nebo z jiného inertního průhledného materiálu (přičemž musí být dodržena podmínka, že materiál neadsorbuje, nereaguje nebo neinterferuje se zkoušeným materiálem). Nádoba může být zakrytá víkem, do kterého musí být vhodným otvorem umožněno vsunutí teploměru pro neustálou kontrolu teploty v průběhu celého disolučního testu, a vyjmutí vzorků. Další součásti přístroje jsou motor, hnací hřídel a míchací jednotka, kterou je válcovitý košíček. Nádoba je částečně ponořená ve vhodné vodní lázni přiměřené velikosti, nebo je vybavená vyhřívaným pláštěm, aby bylo možné udržovat teplotu uvnitř nádoby během zkoušky na  $37 \pm 0,5$  °C. Disoluční médium musí být ve stálém plynulém pohybu a proto nesmí žádná část zařízení ani prostředí, v němž je přístroj umístěn, přispívat ke znatelnému pohybu, třesení nebo vibraci. Nádoba je válcovitého tvaru s půlkulatým dnem o objemu 1 l, výška nádoby je 160 – 210 mm a vnitřní průměr 98 – 106 mm, v horní části má obrubu. Hřídel musí být vystředěna s maximální povolenou odchylkou 2 mm v jakémkoliv bodu od středové

osy nádoby, s plynulou rotací a bez znatelného chvění, které by mohlo ovlivnit výsledky. Dále přístroj obsahuje zařízení pro regulaci rychlosti otáček, aby bylo možné nastavit požadovanou rychlost otáčení hřídele a její udržování v rozmezí  $\pm 4\%$ . Rozměrová specifikace míchací jednotky s košíčkem je znázorněna na Obr. 1. Při vlastním provedení zkoušky se dávkové jednotky vkládají do vysušených košíčků a je nutné udržovat vzdálenost mezi vnitřním dnem nádoby a spodkem košíčku na  $25 \pm 2$  mm.<sup>8</sup>

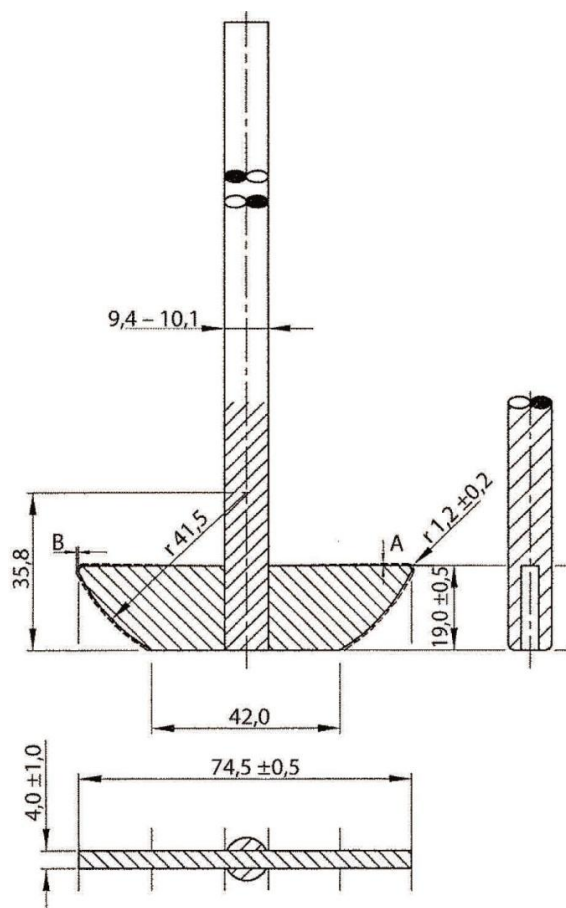


Obr. 1 Specifikace míchací jednotky - košíček<sup>8</sup>

### **Přístroj s pádlem**

Přístroj s pádlem se velmi podobá přístroji s košíčkem, rozdíl je pouze v míchací jednotce, která je tvořena hřídelí s lopatkovým míchadlem. I zde hřídel musí být vystředěna a maximální povolená odchylka je totožná s odchylkou u předcházející metody, její rotace musí být též plynulá a bez znatelného chvění ovlivňujícího výsledky. Svislá středová osa lopatkového míchadla musí procházet osou hřídele tak, že spodek míchadla je v rovině se spodkem hřídele. Rozměry pádla stanovené lékopisem jsou na Obr. 2. Vzdálenost mezi spodkem míchadla a vnitřním dnem nádoby se během zkoušky udržuje na  $25 \pm 2$  mm. Míchadlo může být s hřídelí pevně spojeno a tvořit tak jeden celek nebo je možné dvoudílné provedení s výměnným míchadlem, ale míchadlo s hřídelí zůstává v zařízení během zkoušky vždy pevně

spojené. Lopatkové míchadlo i hřídel se potahují inertním materiálem. Zkoušené dávkové jednotky je nutné přidržet u dna, aby neplavaly nebo se nevznášely v disolučním médiu. Často se používá spirálka vyrobená z nereaktivního materiálu.<sup>8</sup>

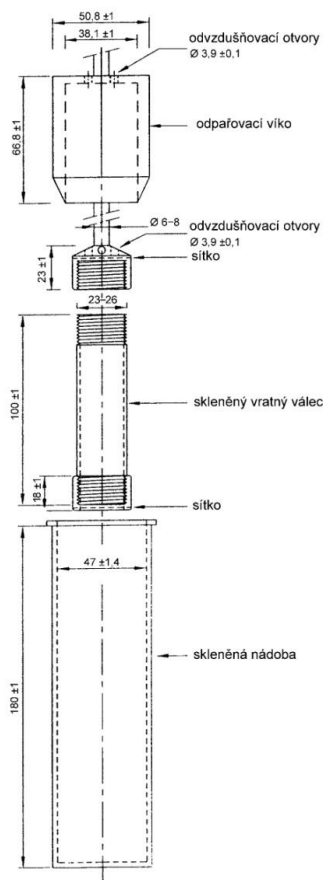


Obr. 2 Specifikace míchací jednotky - pádlo<sup>8</sup>

### **Přístroj s vratným válcem**

Základ zařízení je tvořen ze sady válcovitých skleněných nádob s plochým dnem, sady skleněných vratných válců, inertních úchytek a sítěk z neadsorbujícího a nereaktivního materiálu, které slouží k překrytí horních a dolních částí vratných válců. Dalšími součástmi jsou motor a hnací zařízení k vratnému pohybu válců svisle uvnitř nádob. U některých testů bývá požadováno i pootočení vratných válců vodorovně do další řady nádob, v takovém případě musí hnací zařízení umožňovat i tento pohyb. Nádoby jsou z části ponořené ve vodní lázni, ve které se během zkoušky udržuje teplota  $37 \pm 0,5$  °C. Zařízení musí umožňovat nastavení rychlosti pohybu válců a udržování specifikované míry ponoru v rozmezí  $\pm 5$  %.<sup>8</sup>

Nádoby jsou opatřené odpařovacím víkem. Rozměry součástí přístroje jsou uvedeny na Obr. 3.



Obr. 3 Specifikace míchací jednotky - vratný válec<sup>8</sup>

### **Přístroj s průtokovou celou**

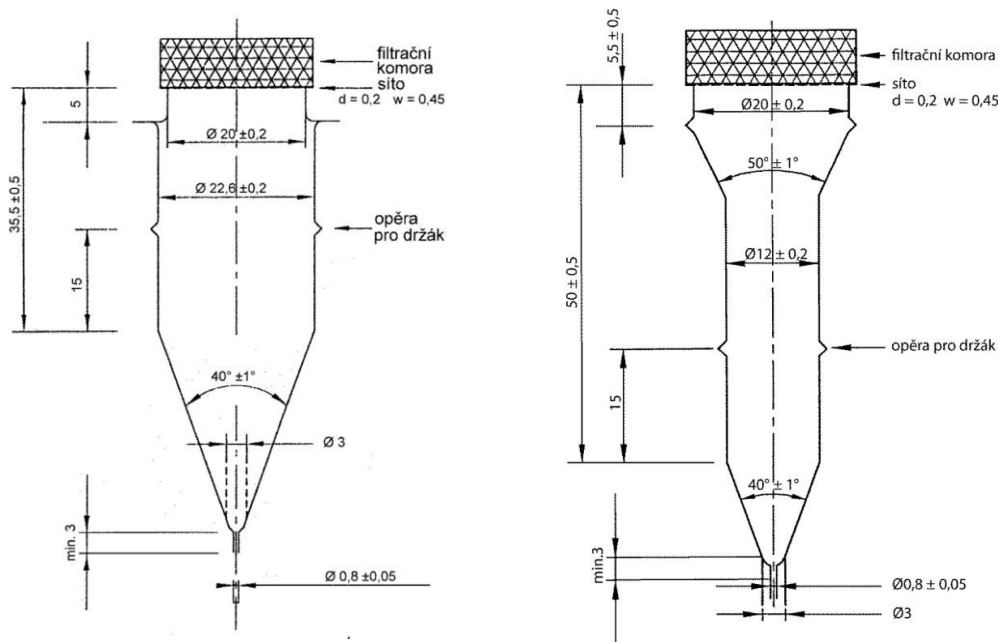
Zařízení se skládá ze zásobní nádoby a pumpy na disoluční médium, průtokové cely a vodní lázně, která udržuje disoluční médium při teplotě  $37 \pm 0,5$  °C. Používá se specifikovaná velikost cely. Přístroj pracuje tak, že pumpa musí vytlačit disoluční médium nahoru přes průtokovou celu, ve které je umístěna dávková jednotka. Pumpa může čerpat rychlostí 240 ml/h až 960 ml/h, při standardním průtoku 4 ml/min, 8 ml/min a 16 ml/min. Pumpa musí zajišťovat konstantní tok ( $\pm 5$  % jmenovitého průtoku), průtokový profil je sinusoidní s pulzací  $120 \pm 10$  pulzů/min. Možné je i použití pumpy s nepulzujícím průtokem.<sup>8</sup>

Průtoková cela vyrobená z průhledného a inertního materiálu je spojena s filtrační komorou zabraňující úniku nerozpuštěných částic z horní části cely. Standardní průměry cely jsou 12 mm a 22,6 mm. Dolní kuželovitá část cely se plní malými



skleněnými kuličkami o průměru asi 1 mm. Ve špičce kužele je jedna větší kulička o průměru asi 5 mm, aby se zabránilo vstupu tekutiny do cely.<sup>8</sup> V průběhu některých pokusů probíhajících v rámci vypracování této diplomové práce byla použita disoluční minicela, která se vkládala do průtokové cely na vrstvu skleněných kuliček. Použití minicely je dále popsáno v experimentální části. Po umístění vzorku do cely se cela ponoří do vodní lázně a teplota se udržuje při  $37 \pm 0,5$  °C. Aby se zabránilo vlivu vibrací, které by mohla způsobovat pumpa, je pumpa od disoluční jednotky oddělená (je umístěna vedle vodní lázně). Pro vedení média systémem se používají spojovací hadičky s vnitřním průměrem 1,6 mm vyrobené z inertního materiálu. Médium je vedeno ze zásobní nádoby umístěné ve vodní lázni do pumpy, dále průtokovou celou přes zkoušený vzorek. V případě provedení otevřené průtokové disoluce se médium odvádí do odpadní nádoby, avšak při uzavřené průtokové disoluci je vedeno zpět do zásobní nádoby.

Obr. 4a) a 4b) znázorňuje rozměry velké a malé průtokové cely tak, jak je požadováno současně platným lékopisem.



a) Velká cela pro tablety a tobolky

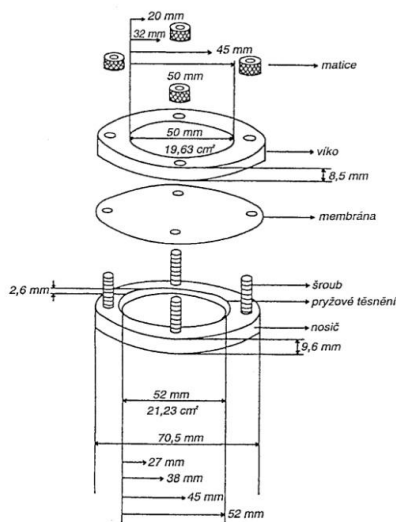
b) Malá cela pro tablety a tobolky

Obr. 4 Specifikace míchací jednotky - průtoková cely<sup>8</sup>

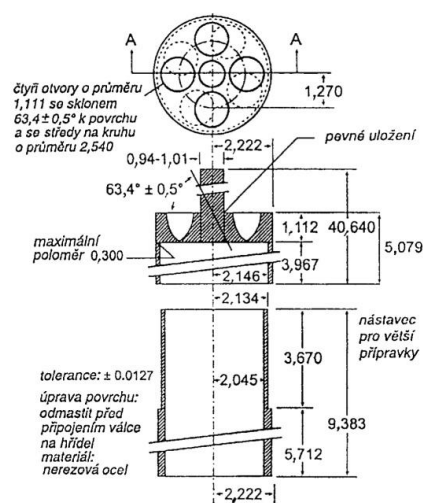
### 6.1.2 Zkouška disoluce transdermálních náplastí

Zkouška disoluce transdermálních náplastí je v ČL uvedena v kapitole 2.9.4, která popisuje přístrojové vybavení, postup vlastní disoluce a hodnocení naměřených výsledků. Lékopis povoluje zkoušení:

- diskovou metodou - používá se přístroj s míchadlem uvedený ve zkoušce pro disoluci pevných perorálních lékových forem vybavený navíc diskem z nerezové oceli ve formě sítky,
- metodou s extrakční celou – používá se přístroj s míchadlem uvedený ve zkoušce pro disoluci pevných perorálních lékových forem vybavený navíc extrakční celou (Obr. 5),
- metodou rotujícího válce - používá se přístroj s míchadlem uvedený ve zkoušce pro disoluci pevných perorálních lékových forem, kde se list míchadla a hřídel nahradí válcem z nerezové oceli (Obr. 6).<sup>8</sup>



Obr. 5 Extrakční cela<sup>8</sup>



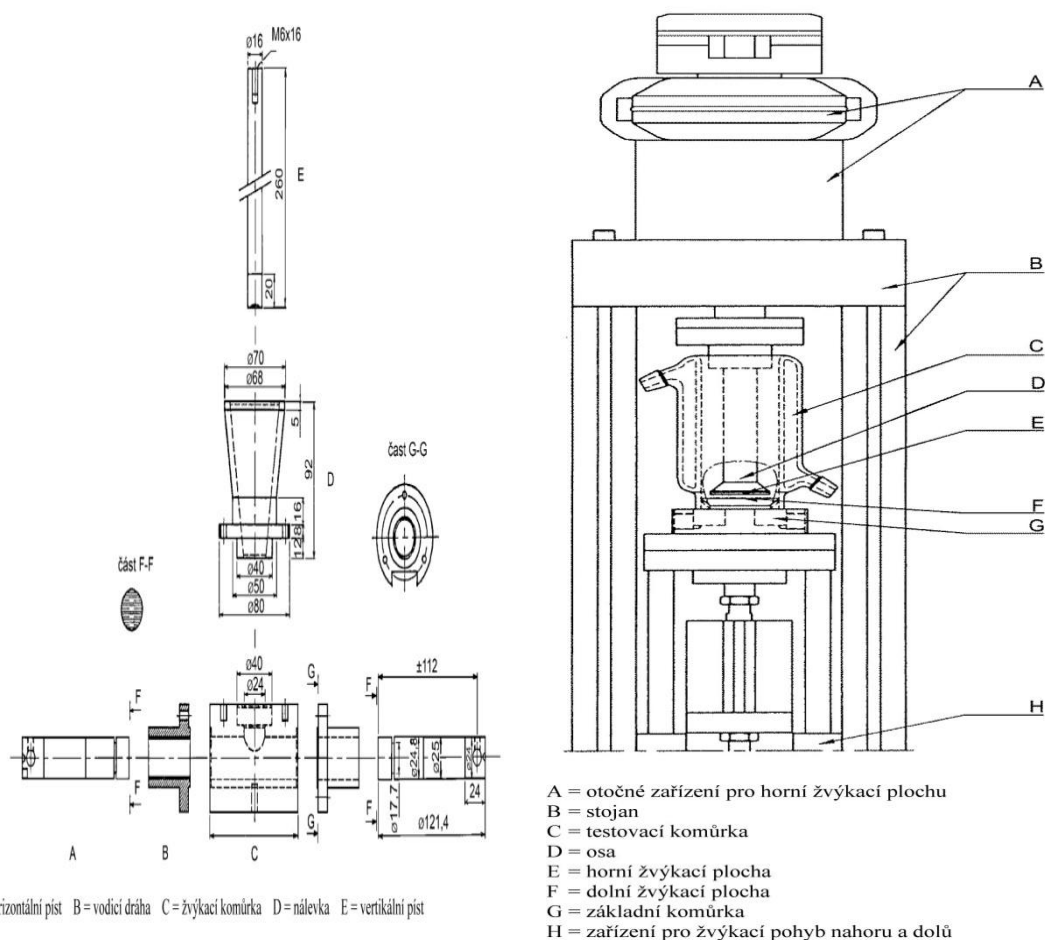
Obr. 6 Rotační válec (rozměry v milimetrech)<sup>8</sup>

Transdermální náplast (nebo její část) se umístí do daného přístroje tak, aby povrch, ze kterého dochází k uvolňování léčiva, mohl být v kontaktu s disolučním médiem. Pro uchycení transdermální náplasti je v případě potřeby možné použít předepsané lepidlo nebo oboustrannou lepicí pásku. Lepidlo nebo lepicí páska musí být indiferentní vzhledem k použité analytické metodě a k adsorpci léčivé látky, jejíž

disoluci stanovujeme. V některých případech je možné náplasti vhodně dělit, při vyhodnocování je nutné toto dělení zohlednit. Existují však i případy, kdy dělení možné není. Sem patří transdermální náplasti membránového typu.<sup>8,9</sup>

### **6.1.3 Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum**

Tato lékopisná zkouška uvedená v kapitole 2.9.25 se používá pro stanovení rychlosti disoluce léčivé látky/léčivých látek (LL) z léčivých žvýkacích gum. Lékopis pro provedení této metody specifikuje 2 přístroje (přístroj A a B), které simulují žvýkání mechanickým hnětáním gumy umístěné v malé komůrce. V přístroji A (Obr. 7a) je hnětení prováděno pomocí 2 horizontálních pístů, přístroj B (Obr. 7b) simuluje žvýkání pohybem horní a dolní žvýkací plochy, mezi které se umístí testovaný léčivý přípravek. Každé stanovení vyžaduje specifikaci týkající se typu použitého přístroje, složení, teploty a objemu disolučního média, rychlosti žvýkání (počet žvýknutí za minutu), času a způsobu vzorkování, musí být též určeno zda se k analýze použijí zbytky gumy nebo disoluční médium a musí být dána analytická metoda k detekci obsahu LL. Množství uvolněné léčivé látky se vyjádří v procentech z obsahu uvedeného v označení na obalu.<sup>8</sup>



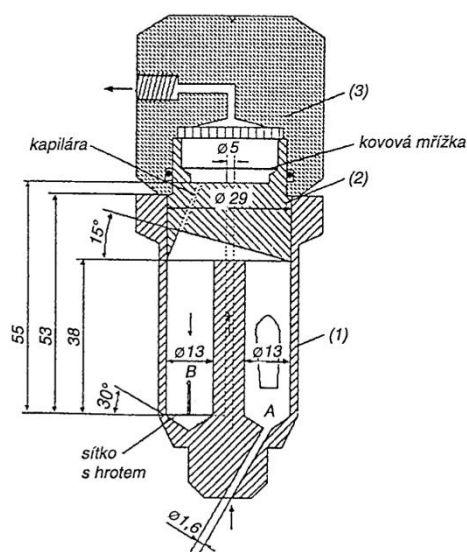
a) Přístroj A

b) Přístroj B

Obr. 7 Přístroje pro disoluci léčivých žvýkacích gum<sup>8</sup>

#### 6.1.4 Zkouška disoluce lipofilních tuhých léčivých přípravků

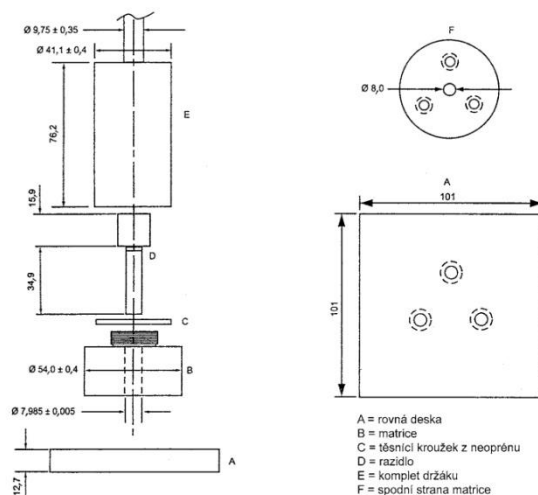
Dříve byla tato zkouška součástí Zkoušky disoluce pevných lékových forem, nyní však oddělením z původního textu vznikla v ČL samostatná stať uvedená v kapitole 2.9.42 Zkouška disoluce lipofilních tuhých lékových forem. Přístroj pro tuto zkoušku se skládá ze zásobní nádoby na disoluční medium, pumpy, speciálně upravené průtokové cely (Obr. 8) a sběrných nádob. Průtoková cela obsahuje v dolní části (1) 2 vzájemně spojené komůrky – do komůrky A se umístí vzorek, přes který ze zásobní nádoby a poté komůrkou B, střední (2) a horní (3) částí cely do sběrných nádob protéká disoluční médium. Zkoušku je možné provést buď v otevřeném nebo uzavřeném systému. Množství uvolněné léčivé látky se stejně jako u předcházející zkoušky disoluce vyjádří v procentech z obsahu uvedeného v označení na obalu.<sup>8,9</sup>



Obr. 8 Průtoková cela pro lipofilní tuhé léčivé přípravky (rozměry v milimetrech)<sup>8</sup>

### 6.1.5 Pravá disoluce

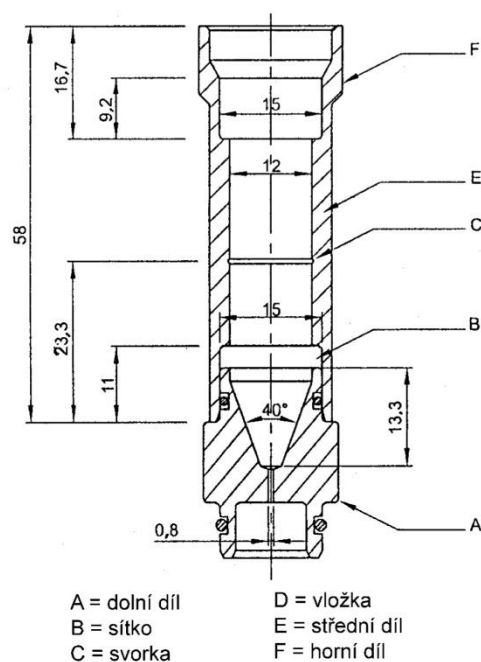
Pravá disoluce je lékopisná zkouška uvedená v ČL v kapitole 2.9.29 a je určená pro stanovení pravé disoluce čistých látek v pevném stavu. Látka se testuje ve formě výlisku. Je definována rychlostí rozpouštění po zhutnění slisování za podmínek konstantní plochy povrchu ve styku s médiem. Rychlost disoluce čistých látek je ovlivněna jednak samotnými vlastnostmi látky, tak vnějšími faktory (podmínky zkoušky), proto musí být pro každou látku jasně specifikovány experimentální podmínky, jako je teplota, použité médium, iontová síla, pH a rychlost míchání. Jednotkou používanou pro rychlost pravé disoluce, která je vyjádřena jako množství látky uvolněné za jednotku času z jednotky povrchu, je miligram za minutu na centimetr čtverečný. Přístroj k získání výlisku (Obr. 9) se skládá z razidla a matrice, která se přes připevněné rameno uchytí do držáku namontovaného k míchacímu zařízení. Tento systém umožňuje ponoření celé matrice do disolučního média, kde díky míchacímu zařízení rotuje. U odebraných vzorků se analytickou metodou s vhodnou citlivostí a přesností provede stanovení obsahu stanovované látky.<sup>8,9</sup>



Obr. 9 Přístroj používaný k získání výlisku pro stanovení pravé disoluce (rozměry v milimetrech)<sup>8</sup>

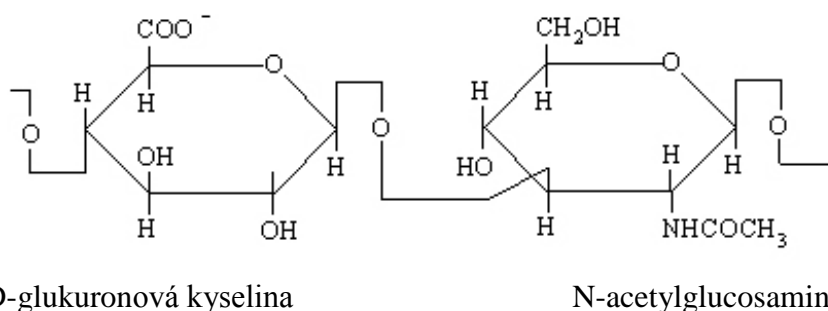
### 6.1.6 Zdánlivá disoluce

Tato metoda uvedená v ČL v kapitole 2.9.43 se používá ke stanovení zdánlivé disoluční rychlosti jak čistých pevných látek, tak léčivých látek z přípravků ve formě prášků nebo granulí. Přístroj pro provedení zkoušky zdánlivé disoluce se skládá ze zásobní nádoby pro médium, pumpy, průtokové cely a vodní lázně. Průtoková cela (Obr. 10) je složena ze 3 propojených částí. Při vlastním provedení zkoušky se do špičky dolní kuželovité části vloží kulička zabraňující úniku testovaného vzorku, na ní se navrství další skleněné kuličky, jejichž velikost je menší než u kuličky umístěné ve špičce cely. Na tyto kuličky se položí soustava sítěk, mezi kterými je vložen vhodný filtr. Střední část slouží pro umístění vzorku, další soustavy sítěk a středové svorky. Pro kompletaci cely se připevní její vrchní díl a spustí se průtok disolučního média v otevřeném nebo uzavřeném systému. Výsledky se dají vyjádřit např. jako množství rozpuštěné látky za jednotku času nebo jako disoluční čas celého vzorku a jeho dílčích etap.<sup>8,9</sup>



Obr. 10 Průtoková cela (rozměry v milimetrech)<sup>8</sup>

## 6.2 Kyselina hyaluronová



Obr. 11 Chemická struktura kyseliny hyaluronové<sup>10</sup>

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní lineární polymer složený z opakujících se disacharidových jednotek  $\beta$ -1,3-N-acetyl glukosaminu a  $\beta$ -1,4-glukuronové kyseliny. Její struktura je znázorněna na Obr. 11. Hodnoty molekulových hmotností HA z různých zdrojů jsou vysoce variabilní a pohybují se v rozmezí od  $10^4$  až  $10^7$  Da. V lidském těle se HA vyskytuje ve formě soli kyseliny hyaluronové a nachází se ve vysokých koncentracích v kůži, pupeční šňůře, sklivci, kloubech a měkkých tkáních.<sup>11</sup>

HA je také přítomna v kapsulách některých mikrobiálních kmenů (např. kmeny streptokoků). HA má významné strukturální, reologické, fyziologické a biologické funkce. Díky výrazné schopnosti retence tekutin a díky viskoelasticitě, spolu s faktem, že nezpůsobuje imunogenitu a toxicitu, nachází HA široké uplatnění v medicíně, kosmetickém a potravinářském průmyslu.<sup>12,13</sup>

Kyselina hyaluronová má díky své schopnosti vázat se na receptory vliv na řadu významných procesů a funkcí buněk a také na změny genové exprese. Má hydratační účinky ve tkáních, podporuje buněčnou migraci, hojení ran, zejména produkci nové granulační tkáně během zánětu. Je syntetizována v buněčné membráně celé řady buněk (nejdůležitější se jeví keratinocyty, fibroblasty a krevní destičky). Biologická aktivita je závislá na molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové nebo jejích fragmentů. HA je velmi hygroskopická látka, tudíž má schopnost chránit buňky před vysoušením a v *in vitro* studiích bylo prokázáno, že v přítomnosti specifických růstových faktorů hraje HA klíčovou roli v buněčné migraci - zejména v migraci fibroblastů, které jsou velmi důležité pro hojení ran. Kyselina hyaluronová rovněž podporuje proliferaci endoteliálních buněk a zvyšuje množství lymfocytů v místě zánětu a tím zajišťuje vhodné podmínky pro uzavření rány. Působí též jako důležitý faktor v regulaci zánětlivé odpovědi.<sup>29</sup>

Tradičně byla HA extrahována z kohoutích hřebínků, nyní se vyrábí především prostřednictvím mikrobiální fermentace (především z *Streptococcus zooepidemicus*.), která má nižší výrobní náklady a způsobuje menší znečištění životního prostředí. Avšak rostoucí obavy vzhledem k tomu, že výroba je prováděna z patogenních streptokoků, tudíž zde nelze vyloučit možnost přítomnosti bakteriálních endotoxinů na HA, mají za následek rozvoj rekombinantní produkce HA.<sup>12</sup> Pro rekombinantní výrobu je možné jako hostitele použít *Bacillus subtilis*<sup>14</sup>, *Lactococcus lactis*<sup>15</sup>, *Agrobacterium*<sup>16</sup> a *Escherichia coli*<sup>17</sup>

### **6.3 Hyaluronová mikrovlákná**

Hyaluronan jako biopolymer může být zpracován do celé řady forem. Jednou z nich je výroba vláknenných struktur, které je možné využít v různých oblastech medicíny. V případě mikrovláknenných struktur se jedná o vlákna s průměrem desítek až stovek mikrometrů. Možná je i tvorba vláken s nižším průměrem a to v desítkách



až stovkách nanometrů, v takovém případě hovoříme o nanovlákních. U obou forem vláken je výrazný potenciál k rozšiřování jejich využití v tkáňovém inženýrství, v regenerativní medicíně apod. Mikrovlákna se dají využít jednak pro přípravky na hojení jak externích, tak i interních ran, jako nosiče pro řízené uvolňování léků, využití mají též jako separační a antiadhezivní materiály, vstřebatelné sítěky potřebné při různých chirurgických zákrocích, dále jako výplně nežádoucích dutin.<sup>1</sup>

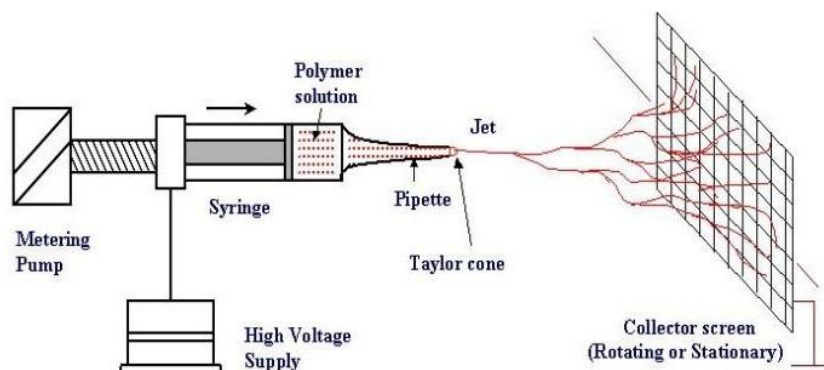
Rychlost biodegradace vláken a textilních výrobků z nich vyrobených závisí na tom jaký byl použit typ hyaluronanu. Pokud se jedná o vlákna z nativního hyaluronanu, zmizí z organismu v řádu hodin, v případě vláken z hydrofobního hyaluronanu nebo síťovaného hyaluronanu dochází k biodegradaci za několik dní až měsíců.<sup>18</sup>

Pro textilní zpracování do podoby nitě nebo příze, které by umožňovalo z mikrovláken vyrobit tkaniny, pleteniny nebo netkané textilie je nejvhodnější jednovláknová forma vlákna s průměrem v desítkách mikrometrů.

K výrobě mikrovláken lze použít jednak nativní, tak i chemicky modifikovaný hyaluronan, což dle typu modifikace umožňuje regulovat a ovlivňovat řadu vlastností finálního vlákna. Ovlivnit můžeme zejména rozpustnost ve vodném prostředí a rychlost degradace tkáňovými enzymy. Možnost vytvářet z mikrovláken plošné i prostorové struktury, které se mohou lišit mechanickými vlastnostmi (pružná pletenina, pevná tkanina), a které navíc mohou být různě strukturované z pohledu obsahu aktivních látek, je značnou výhodou ovlivnitelnou způsobem zpracování.<sup>1</sup>

Nejčastěji používanou metodou pro přípravu mikrovláken je metoda elektrospinningu (princip znázorňuje Obr. 12), která k produkci vláken využívá působení elektrostatických sil o velmi vysokém napětí v řádech kV na roztok polymeru.<sup>22</sup> Možné je použití horizontální nebo vertikální metody. Zařízení pro elektrospinning obsahuje 3 základní komponenty: zdroj vysokého napětí, zvláknovací trysku (kapiláru) a kolektor. Realizace probíhá tak, že na kapky roztoku biopolymeru, které jsou vytlačovány z kapiláry, působí elektrostatické pole a tímto působením dojde k deformaci povrchu kapaliny, čímž vznikne tzv. Taylorův kužel. Při dalším zvýšení elektrického napětí (až k dosažení tzv. kritické hodnoty) dojde

k vystřelování proudu kapaliny směrem ke kolektoru. Během letu proudu tekutiny dojde k odpaření rozpouštědla a tím k přeměně na již hotová mikrovláknna.<sup>1,19,20,21</sup>



Obr. 12 Princip electrospinnigu<sup>22</sup>

## 6.4 Dip-coating

Dip-coating je metoda určená k nanášení substance na různé materiály pomocí kontrolovaného ponořování a vyjmutí daného materiálu do a ze zásobní tekutiny pro účely vytvoření jedné nebo více vrstev potahu. Tato technika je v současnosti hojně využívána ve výzkumných projektech zabývajících se mikro- a nanovláknennými materiály a jejich využitím v medicíně.<sup>23</sup>

Tloušťka potahové vrstvy se obecně zvyšuje s nižší rychlostí vynořování materiálu ze zásobní tekutiny a je ovlivněna především viskozitou kapaliny, hustotou kapaliny a povrchovým napětím. Pro výrobu vysoce kvalitních produktů jsou vyžadována zařízení, která jsou schopna docílit stejnoměrné tloušťky potahové vrstvy na celé ploše potahovaného materiálu.<sup>24</sup>

Kvalita potahu je ovlivněna mnoha faktory, zejména původním stavem povrchu substrátu, délkou trvání ponoru, rychlostí vyjmutí materiálu ze zásobní tekutiny, počtem cyklů namáčení, složením a teplotou zásobní tekutiny, teplotou a vlhkostí okolního prostředí.<sup>23</sup>

Tekutiny určené k potahování mohou být Newtonovské tekutiny, ale i složené tekutiny obsahující roztoky tenzidů nebo povrchově aktivních látek, vícesložkové systémy tenzidů nebo povrchově aktivních látek, polymerní roztoky nebo suspenze.<sup>25</sup> Při hledání optimálních podmínek pro potahování určitého materiálu je vhodné hodnocení šířky vrstvy a její optické hustoty na potahovaném materiálu a následné

porovnání výsledků mezi procesy probíhajícími za různých podmínek. Toto hodnocení je možné provést pomocí spektroskopické elipsometrie.<sup>26</sup>

Techniku dip-coatingu je možné provést několika způsoby, v této práci jsou popsány 2 nejpoužívanější a to:

- self-assembly technika,
- sol-gel technika.<sup>23,25</sup>

### **Self-assembly dip-coating**

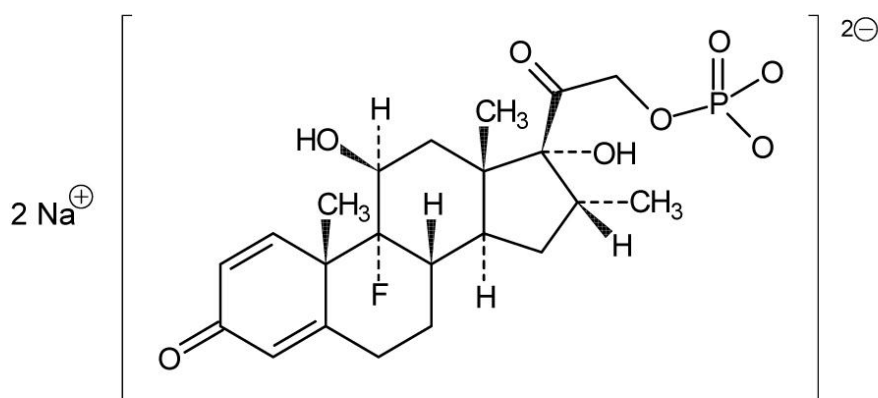
Jedná se o proces, kdy se jednotlivé složky na povrchu potahovaného materiálu spontánně organizují a seskupují do složitějších objektů. Metoda umožňuje pouze jednovrstevné potažení, které tvoří „hlavy“ a „ocasy“ strukturálních molekul. Nejprve dojde k chemisorpci „hlav“ molekul na substrát, což je následováno pomalým seskupováním koncových částí molekul.<sup>27</sup>

### **Sol-gel dip-coating**

Jedná se o široce využívanou techniku potahování nejrůznějších materiálů v mnoha odvětvích. Využívá se například k vytvoření ochranných nátěrů a optických povlaků. Průběh tohoto procesu je poměrně složitý, zjednodušeně lze říci, že na začátku procesu dojde k hydrolýze monomeru (sol), který následně podléhá polykondenzaci a postupně se mění v gel. Tento gel je bifázový systém obsahující jak kapalnou fázi (rozpouštědlo), tak pevnou fázi (polymerní síť). Poté postupně dochází ke snižování množství kapalné fáze. Zbytek kapaliny může být odstraněn sušením.<sup>23,28</sup>

Jak je již zmíněno v úvodu této kapitoly, významný je rozvoj využití dip-coatingu v potahování mikro- a nanovláken využitelných v medicíně. Jako slibné se jeví snahy o vývoj implantátů, které by sloužily ke vkládání do tělních dutin, z vláken vyrobených ze vstřebatelného materiálu (kterým je například kyselina hyaluronová), kdy se tyto implantáty pomocí dip-coatingu potáhnou jednou nebo více vrstami tekutiny obsahující léčivo. Toto léčivo by se po aplikaci implantátu postupně uvolnilo a po jeho uvolnění by došlo k biodegradaci implantátu. Tím by došlo k odstranění nutnosti dalšího chirurgického zásahu do těla pacienta.<sup>29</sup>

## 6.5 Dexamethason-fosfát sodná sůl



Obr. 13 Chemická struktura DXF<sup>30</sup>

DXF je bílý nebo téměř bílý velmi hygroskopický prášek, který je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu 96% a prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Chemicky se jedná o dinatrium-9-fluor-11 $\beta$ ,17-dihydroxy-16 $\alpha$ -methyl-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-yl-fosfát. Chemickou strukturu znázorňuje Obr. 13.

Molekulový vzorec DXF je C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P a M<sub>r</sub> odpovídá hodnotě 516,41.<sup>30</sup>

Dexamethason patří do skupiny léků známých jako kortikosteroidy. Může být použit k léčbě různých stavů. Využívá se k substituční terapii (léčba adrenokortikální insuficience), supresivní terapii i k léčbě neendokrinních onemocnění. Z posledně jmenované skupiny je dexamethason indikován k léčbě onemocnění dýchacích cest (zejména pak asthma bronchiale), různých kožních onemocnění (jako je atopická dermatitida, psoriáza, hyperkeratóza, ekzémy, ekzematoidní dermatitida), závažných alergických reakcí vedoucích až k anafylaktickému šoku, některých očních onemocnění, revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střev (příkladem je Crohnova choroba), některých onemocnění krve (idiopatická trombocytopenická purpura) a některých typů rakoviny (buď samostatně nebo častěji v kombinacích s dalšími chemoterapeutiky). Vzhledem k různorodosti indikací je dexamethason dostupný v různých lékových formách, zejména jako dermální masti a krémy, perorální tablety, kapsle, injekce, orální pasty, oční kapky a masti, ušní kapky. Léčivé přípravky s dexamethasonem často využívají kombinací s dalšími léčivými

látkami jako jsou antibiotika, keratolytika, keratoplastika, lokální anestetika a dehty.<sup>31,32</sup>

Lokálně dexamethason působí antiflogisticky, antialergicky, antipruriginózně a antiexsudativně. Po aplikaci na kůži prostupuje do epidermis a tam se váže na specifické receptory. Co se týče perkutánní resorpce, tak ta je poměrně nízká. Jak výrazná bude resorpce ovlivňuje řada faktorů, výrazný vliv má aktuální stav integrity epidermálních bariérových systémů a způsob jakým byl dexamethason zpracován do lékové formy, zejména koncentrace účinných látek, možné interakce a stupeň jejich disperzity.<sup>32</sup>

I přes jeho široké terapeutické využití je důležité brát při léčbě dexamethasonem zřetel na možné nežádoucí účinky, kterých je celá řada a jejichž závažnost se zvyšuje s velikostí dávky a délkou léčby. Mezi nežádoucí účinky patří potlačení imunitního systému (snižuje se odolnost vůči infekcím), zhoršené hojení ran, atrofie kůže, manifestace, eventuelně dekompenzace, cukrovky, psychické poruchy (depresivní nebo naopak manické stavy), vznik očního glaukomu, vznik vředové choroby, hemoragie v trávicím traktu, dále osteoporóza, hypertenze, urychlení vývoje aterosklerózy, retence sodíku a vody, vznik disproporční obezity, útlum hypothalamo-hypofyzární osy, hirsutismus, hypogonadismus a u dětí též útlum růstu.<sup>31</sup>

Významnost dexamethasonu dokazuje skutečnost, že je uveden v dokumentu WHO obsahující seznam nezbytných léčiv. Je považován za esenciální léčivo v několika kategoriích – v léčbě některých symptomů v rámci paliativní terapie, léčbě anafylaktického šoku, v hormonální substituční léčbě, jako léčivo podávané těhotným a jako antiemetikum.<sup>33</sup>

## **7 Experimentální část**

### **7.1 Použité suroviny**

Dexamethason - fosfát sodná sůl  $\geq 98\%$  – Sigma – Aldrich ®, Česká republika

Čištěná voda – Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Česká republika

Chlorid sodný, 2 a 3A – Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, 2 a 3A – Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, 2 a 3A - Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika

Hyaluronové mikrovláknno s dispergovaným API– Contipro Biotech s.r.o., Česká republika

### **7.2 Použité přístroje**

Analytické váhy ABJ 120-4M (Kern&Sohn GmbH, Německo, d = 0,1 mg)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super RK 106 (Bandelin electronic GmbH&Co. KG, Německo)

Vodní lázeň TW20 (Julabo GmbH, Německo)

Pístová pumpa CY 1-50 (Sotax, Švýcarsko)

pH-metr HI 221 (Hanna instruments, US)

Disoluční testovací jednotka Dissotest CE 1 (Sotax, Švýcarsko)

Disoluční minicela USP Apparatus 4 Dialysis insert (Sotax, Švýcarsko)

Spektrofotometr SPECORD 205 (AnalytikJena, UK)

Optický mikroskop Olympus BX 1 (Olympus, Japonsko)

Křemenné kyvety 6030-UV (Hellma Analytics, US)

Dialyzační membrána Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 6-8000 Da (Spectrum Laboratories Inc., US)

## **7.3 Použité metody**

### **7.3.1 Příprava izotonického fosfátového pufru (IPB)**

Rozpustila jsem odděleně 2,1 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 500 ml čištěné vody a 19,1 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu ve 400 ml čištěné vody. Poté jsem k 500 ml dihydrogenfosforečnanu sodného přidala 200 ml hydrogenfosforečnanu sodného a změřila pH. Doladění pH jsem provedla za stálého míchání na magnetické míchačce pod pH-metrickou kontrolou postupným přidáváním roztoku hydrogenfosforečnanu sodného na požadovanou hodnotu pH. Pomocí odměrného válce jsem zjistila objem připraveného pufru a přidala takové množství chloridu sodného (4,4 g/l), aby byl vzniklý pufr izotonický.

### **7.3.2 Příprava kalibračních roztoků**

Pro stanovení obsahu jsem připravila zásobní roztok sodné soli dexamethason - fosfátu (DXF) v čištěné vodě o koncentraci 1 mg/ml tak, že jsem látku navážila přesně na analytických vahách ( $d = 0,1$  mg), poté jsem navážku kvantitativně převedla do odměrné baňky, doplnila čištěnou vodou vytemperovanou na  $20 \pm 0,5$  °C po rysku a protřepala.

Poté jsem ředěním vodou  $20 \pm 0,5$  °C připravila sadu kalibračních roztoků v koncentracích 0,002-0,04 mg/ml.

Stejným postupem jsem připravila kalibrační roztoky v izotonickém fosfátovém pufru pH 7,4.

### **7.3.3 Měření absorbance**

Před začátkem měření je nutné spektrofotometr zapnout a nechat lampu alespoň 15 minut temperovat. Pro nalezení vhodné vlnové délky jsem proměřila absorbanci roztoku DXF v rozsahu 230 – 255 nm. Ačkoliv lékopisem je jako vlnová délka s maximem absorpce pro DXF udána vlnová délka 254 nm<sup>30</sup>, tak pro potřeby této diplomové práce byla zvolena jako optimální vlnová délka 242,3 nm, jelikož při této vlnové délce bylo nalezeno absorpční maximum.

Do vysušených křemenných kyvet naplnila postupně všechny připravené kalibrační roztoky a pro každý roztok jsem naměřila absorbanci při 242,3 nm v 5 opakováních

proti slepému vzorku, kterým byla u vodných roztoků čištěná voda, u roztoků v pufru fosfátový pufr.

Závislost mezi absorbancí A a koncentrací c (mg/ml) popisují kalibrační rovnice pro vodu:

$$A = 26,4960 \cdot c + 0,0061 \quad (1)$$

kde A je absorbance a c (mg/ml) je koncentrace dexamethasonu ( $R^2 = 0,9995$ ) a pro pufr:

$$A = 25,921 \cdot c + 0,0075 \quad (2)$$

kde symboly mají stejný význam jako v předchozí rovnici (1) ( $R^2 = 0,9994$ ).

### **7.3.4 Disoluční test**

K disolučním testům jsem použila vždy cca 0,02 g mikrovláknů naváženého s přesností na 0,1 mg (navážky vláken pro jednotlivé disoluční pokusy jsou uvedeny v Tab. 18). Uvolňování léčiva ze vzorků jsem sledovala při stacionární disoluci v uzavřené lahvičce nebo průtokovou disolucí v disoluční cele. Pro snazší orientaci ve vzorcích jsem vzorky označila kódy jako kombinací metodiky disoluce a podmínek disoluce:

- DM označuje disoluci vlákna umístěného v dialyzační membráně
- první 2 číslice značí teplotu ve °C, při kterých disoluční zkouška probíhala
- následuje písmeno, které značí použité médium (V – voda nebo F – fosfátový pufr pH 7,4)
- číslo šarže (1 nebo 2)
- číslo vzorku (1-3)
- poslední trojčíslí značí časy odběrů vzorků

Př. 25V11081 znamená, že se jedná o disoluci, která probíhala při 25°C u vzorku z 1. šarže pořadové číslo vzorku 1, ve vodě v čase 81 minut

K disolučnímu testu jsem použila vždy vlákno bez léčiva a vlákno s léčivem (DXF) ve dvou různých šaržích. Ve stejném uspořádání jsem disoluci také realizovala z vláken uzavřených v dialyzační membráně.



#### **7.3.4.1 Stacionární disoluce**

Pro stacionární disoluční zkoušku jsem použila 2 různé šarže mikrovlákn s dexamethasonem. Z každé šarže jsem použila 3 vzorky pro disoluci. Jako médium jsem použila buď čištěnou vodu nebo izotonický fosfátový pufr pH 7,4 (IPB). Disoluce probíhala při teplotě  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , bez míchání, za občasného protřepávání.

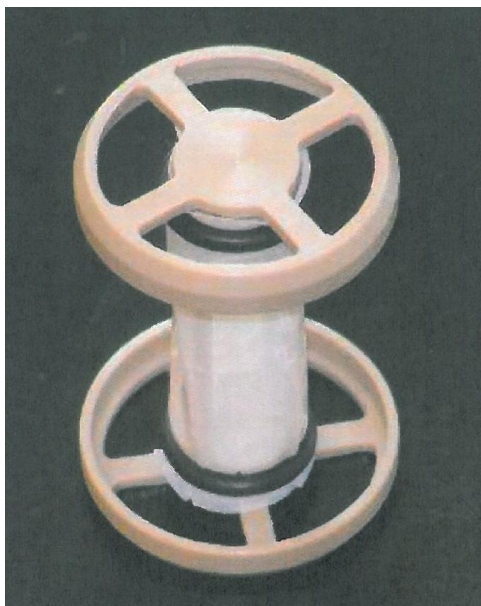
Pro ověření množství DXF na gram vlákna jsem použila vzorek mikrovlákn s dexamethasonem. Navážku vlákna (cca 0,02 g) jsem vložila do lahvičky a zalila disolučním médiem. Jako médium jsem použila buď 10 ml čištěné vody nebo izotonického fosfátového pufru pH 7,4. Disoluce probíhala při teplotě  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , bez míchání, za občasného protřepávání, po dobu 48 hod. V čase 24 hod a 48 hod jsem odebrala 2 ml media ke stanovení obsahu DXF. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 20.

Při vlastním disolučním pokusu jsem vzorky vlákna (s přesností na 0,1 mg), případně vzorky v dialyzační membráně, umístila do uzavíratelných lahviček a vzorek zalila 7 ml disolučního média (vody nebo IPB). V časech 3, 9, 27, 81 a 243 minut jsem mikropipetou z každé lahvičky odebrala 2 ml vzorku a nahradila je 2 ml média. U každého odebraného vzorku jsem proti příslušnému slepému vzorku zjistila sérií 5 měření absorbanci.

#### **7.3.4.2 Průtoková disoluce**

Použila jsem metodu průtokové disoluce v disoluční testovací jednotce Dissotest CE 1. Disoluce probíhala při teplotě  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Rychlost průtoku jsem zvolila cca 10 ml/min pro čištěnou vodu a/nebo cca 20 ml/min pro fosfátový pufr pH 7,4.

### S dialyzační membránou



a) Disoluční minicela



b) Minicela v disoluční jednotce CE 1

Obr. 14 Disoluční minicela pro průtokovou disoluci s dialyzační membránou

Navážku mikrovlnáka jsem umístila do disoluční minicely, na které byla natažena dialyzační membrána (Obr. 14a). Minicelu jsem následně umístila do průtokové disoluční jednotky CE 1, kterou procházelo médium (Obr. 14b).

V předem určených intervalech jsem v časech 2 až 46 minut odebírala vzorky k analýze obsahu léčiva

### Bez dialyzační membrány



Za stejných podmínek disoluce (teplota, průtok media) jsem disoluci realizovala tak, že navážku mikrovlnáka jsem umístila přímo do dialyzační jednotky naplněné skleněnými kuličkami.

Obr. 15 Disoluční cela pro průtokovou disoluci bez dialyzační membrány

### 7.3.5 Zpracování výsledků

Z 5 naměřených hodnot absorbance jsem u každého odebraného vzorku vypočítala průměrnou hodnotu absorbance ( $A$ ). Výsledky jsou uvedené v Tab. 1-8; průměrné hodnoty  $A$  pro slepé vzorky z 5 naměřených hodnot absorbancí uvádí Tab. 9.

Hodnoty  $A$  jsem následně zkorigovala na slepý vzorek ( $A_k$ ) jako rozdíl průměrné hodnoty absorbance vzorku s léčivem a slepého vzorku (vlákno bez léčiva). Z hodnoty  $A_k$  jsem pomocí kalibrační rovnice vypočítala hodnotu koncentrace DXF  $c$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) v každém odebraném vzorku a následně vyjádřila kumulativní koncentraci DXF  $c_k$  v  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky shrnují Tab. 10-17.

Závislost kumulativní koncentrace uvolněného DXF na čase jsem u každého vzorku vyhodnotila graficky. Výsledky pro sledované vzorky při stacionární disoluci v závislosti na podmínkách disoluce (disoluční médium, dialyzační membrána) jsou shrnuty na Obr. 16–19.

Za předpokladu (ověřeného též experimentálně), že na vlákne bylo fixováno 17 mg DXF/gram jsem z hmotnosti použitého vlákna vyjádřila teoreticky dosažitelnou koncentraci DXF a vypočítala uvolněné množství DXF v procentech. Výsledky při stacionární disoluci jsou ilustrovány na Obr. 20-21.

Koncentraci uvolněného DXF u průtokové disoluce v otevřeném systému jsem vypočítala v každém jednotlivém odebraném vzorku ( $c$  v  $\mu\text{g/ml}$ ), s využitím kalibrační rovnice (1) pro vodné médium a kalibrační rovnice (2) pro fosfátový pufr. Tuto koncentraci jsem následně převedla na diferenciální koncentraci ( $c_{\text{diff}}$  v  $\mu\text{g/ml}$ ) s využitím rychlosti průtoku  $v$  ( $\text{ml/min}$ ) a času odběru vzorku ( $t$  v  $\text{min}$ ) podle rovnice:<sup>7</sup>

$$c_{\text{diff}} = (c \cdot v \cdot t) / 1000 \quad (3)$$

Následně jsem vyjádřila kumulativní koncentraci  $c_k$  v  $\mu\text{g/ml}$ .

## 8 Výsledky

Tab. 1 Absorbance vzorků při stacionární disoluci do vody

Čas	Vzorek	A					
							průměr
3	25V11	0,97489	0,97484	0,97472	0,97452	0,97464	0,97472
9		0,79888	0,79877	0,79868	0,79856	0,79840	0,79866
27		0,56619	0,56610	0,56612	0,56588	0,56575	0,56601
81		0,40428	0,40422	0,40410	0,40399	0,40390	0,40410
243		0,28393	0,28384	0,28393	0,28414	0,28421	0,28401
3	25V12	1,07086	1,07086	1,07110	1,07087	1,07062	1,07086
9		0,84690	0,84684	0,84695	0,84691	0,84699	0,84692
27		0,61705	0,61778	0,61960	0,62134	0,62244	0,61964
81		0,43906	0,43909	0,43906	0,43908	0,43915	0,43909
243		0,32220	0,31831	0,31574	0,31505	0,31467	0,31719
3	25V13	1,03945	1,03978	1,03999	1,04026	1,04042	1,03998
9		0,75621	0,75613	0,75628	0,75628	0,75609	0,75620
27		0,55175	0,55156	0,55119	0,55096	0,55071	0,55123
81		0,42029	0,42022	0,42013	0,42033	0,42034	0,42026
243		0,26662	0,26670	0,26704	0,26760	0,26837	0,26727

Tab. 2 Absorbance vzorků při stacionární disoluci do vody

Čas	Vzorek	A					
							<b>průměr</b>
3	25V21	1,32809	1,32779	1,32806	1,32750	1,32776	1,32784
9		1,00469	1,00479	1,00472	1,00494	1,00468	1,00476
27		0,75165	0,75169	0,75186	0,75189	0,75199	0,75182
81		0,55594	0,55638	0,55642	0,55645	0,55637	0,55631
243		0,38203	0,38195	0,38199	0,38204	0,38217	0,38203
3	25V22	1,06241	1,06247	1,06253	1,06234	1,06247	1,06244
9		0,89237	0,89245	0,89225	0,89224	0,89229	0,89232
27		0,80312	0,80328	0,80329	0,80336	0,80330	0,80327
81		0,64872	0,64875	0,64895	0,64882	0,64903	0,64885
243		0,46994	0,46980	0,46973	0,46974	0,46968	0,46978
3	25V23	1,44147	1,44083	1,44138	1,44102	1,44077	1,44110
9		1,08894	1,08896	1,08858	1,08835	1,08772	1,08851
27		0,77760	0,77741	0,77766	0,77746	0,77738	0,77750
81		0,56472	0,56496	0,56542	0,56569	0,56620	0,56540
243		0,41352	0,41347	0,41345	0,41347	0,41344	0,41347

Tab. 3 Absorbance vzorků při stacionární disoluci do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A					
							<b>průměr</b>
3	25F11	0,72784	0,72775	0,72782	0,72765	0,72770	0,72775
9		0,59470	0,59482	0,59467	0,59479	0,59475	0,59474
27		0,59082	0,59065	0,59049	0,59041	0,59042	0,59056
81		0,63138	0,63143	0,63151	0,63143	0,63140	0,63143
243		0,59298	0,59310	0,59320	0,59326	0,59332	0,59317
3	25F12	0,62604	0,62610	0,62613	0,62609	0,62606	0,62608
9		0,52768	0,52753	0,52763	0,52753	0,52750	0,52758
27		0,54654	0,54667	0,54676	0,54681	0,54682	0,54672
81		0,49807	0,49844	0,49881	0,49910	0,49913	0,49871
243		0,49500	0,49484	0,49476	0,49504	0,49531	0,49499
3	25F13	0,59023	0,59037	0,59029	0,59035	0,59048	0,59035
9		0,59960	0,59963	0,59959	0,59962	0,59967	0,59962
27		0,52078	0,52074	0,52082	0,52078	0,52081	0,52078
81		0,60248	0,60244	0,60250	0,60246	0,60236	0,60245
243		0,56637	0,56631	0,56632	0,56632	0,56628	0,56632

Tab. 4 Absorbance vzorků při stacionární disoluci do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A					
							<b>průměr</b>
3	25F21	0,79949	0,79934	0,79942	0,79938	0,79947	0,79942
9		0,64958	0,64944	0,64944	0,64951	0,64947	0,64948
27		0,67450	0,67466	0,67463	0,67456	0,67430	0,67453
81		0,63147	0,63150	0,63151	0,63157	0,63149	0,63151
243		0,55423	0,55411	0,55408	0,55402	0,55407	0,55410
3	25F22	0,91305	0,91267	0,91280	0,91291	0,91267	0,91282
9		0,75733	0,75729	0,75728	0,75720	0,75740	0,75730
27		0,68128	0,68125	0,68127	0,68120	0,68132	0,68126
81		0,59186	0,59189	0,59180	0,59172	0,59161	0,59178
243		0,49466	0,49460	0,49457	0,49446	0,49447	0,49455
3	25F23	0,71127	0,71113	0,71137	0,71132	0,71120	0,71126
9		0,56983	0,56980	0,56976	0,56983	0,56977	0,56980
27		0,80006	0,80000	0,80024	0,80026	0,80033	0,80018
81		0,66745	0,66748	0,66788	0,66791	0,66793	0,66773
243		0,54920	0,54914	0,54908	0,54904	0,54899	0,54909

Tab. 5 Absorbance vzorků při stacionární disoluci s dialyzační membránou do vody

Čas	Vzorek	A					
							průměr
3	DM25V11	0,01182	0,01183	0,01186	0,01187	0,01189	0,01185
9		0,13163	0,13158	0,13159	0,13162	0,13175	0,13163
27		0,31130	0,31124	0,31130	0,31132	0,31132	0,31130
81		0,97850	0,97799	0,97799	0,97794	0,97813	0,97811
243		1,11101	1,11121	1,11104	1,11111	1,11088	1,11105
1440		0,98634	0,98634	0,98615	0,98647	0,98603	0,98626
3	DM25V12	0,12577	0,12556	0,12544	0,12541	0,12534	0,12551
9		0,30616	0,30626	0,30628	0,30617	0,30602	0,30618
27		0,64460	0,64475	0,64469	0,64464	0,64476	0,64469
81		0,91734	0,91687	0,91660	0,91683	0,91637	0,91680
243		1,02050	1,02075	1,02078	1,02039	1,02027	1,02054

Tab. 6 Absorbance vzorků při stacionární disoluci s dialyzační membránou do vody

Čas	Vzorek	A					
							průměr
3	DM25V21	0,06163	0,06165	0,06169	0,06166	0,06164	0,06166
9		0,24782	0,24784	0,24787	0,24783	0,24788	0,24785
27		0,49670	0,49670	0,49671	0,49672	0,49669	0,49671
81		0,76466	0,76437	0,76393	0,76415	0,76481	0,76438
243		0,80677	0,80663	0,80652	0,80643	0,80665	0,80660
1440		0,52725	0,52743	0,52771	0,52760	0,52735	0,52747
3	DM25V22	0,01302	0,01305	0,01313	0,01319	0,01320	0,01312
9		0,10666	0,10670	0,10671	0,10674	0,10675	0,10671
27		0,47511	0,47510	0,47505	0,47512	0,47519	0,47511
81		0,79425	0,79444	0,79448	0,79430	0,79456	0,79441
243		0,83213	0,83205	0,83178	0,83201	0,83172	0,83194



Tab. 7 Absorbance vzorků při stacionární disoluci s dialyzační membránou do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A					
							<b>průměr</b>
3	DM25F11	0,08076	0,08080	0,08078	0,08078	0,08076	0,08078
9		0,24851	0,24849	0,24853	0,24854	0,24851	0,24852
27		0,63483	0,63474	0,63477	0,63472	0,63487	0,63479
81		0,87369	0,87353	0,87334	0,87366	0,87368	0,87358
243		0,79443	0,79367	0,79362	0,79381	0,79388	0,79388
4320		0,67751	0,67735	0,67751	0,67760	0,67746	0,67749
3	DM25F12	0,00645	0,00641	0,00638	0,00632	0,00632	0,00638
9		0,09477	0,09483	0,09482	0,09480	0,09475	0,09479
27		0,09107	0,09109	0,09106	0,09109	0,09115	0,09109
81		0,67902	0,67901	0,67891	0,67891	0,67901	0,67897
243		1,02980	1,02980	1,02971	1,02952	1,02908	1,02958

Tab. 8 Absorbance vzorků při stacionární disoluci s dialyzační membránou do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A					
							<b>Průměr</b>
3	DM25F21	0,02771	0,02772	0,02777	0,02780	0,02787	0,02777
9		0,05741	0,05731	0,05714	0,05705	0,05698	0,05717
27		0,24870	0,24857	0,24842	0,24813	0,24804	0,24837
81		0,71434	0,71424	0,71415	0,71405	0,71387	0,71413
243		0,91797	0,91833	0,91827	0,91840	0,91832	0,91825
3	DM25F22	0,02541	0,02548	0,02561	0,02565	0,02556	0,02554
9		0,06602	0,06611	0,06616	0,06644	0,06665	0,06628
27		0,21416	0,21403	0,21374	0,21350	0,21368	0,21382
81		0,36180	0,36174	0,36184	0,36212	0,36217	0,36193
243		0,66329	0,66325	0,66327	0,66298	0,66278	0,66311

Tab. 9 Absorbance slepých vzorků

Čas	A			
	25V0	25F0	DM25V0	DM25F0
3	0,14904	0,02016	0,01476	0,00828
9	0,10379	0,07342	0,04588	0,01267
27	0,07516	0,08198	0,05855	0,05020
81	0,05224	0,07380	0,04694	0,06238
243	0,03711	0,03891	0,14047	0,08693

Tab. 10 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci do vody

Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (µg/ml)	c <sub>k</sub> (µg/ml)
3	25V11	0,82568	30,9	30,9
9		0,69486	26,0	34,8
27		0,49084	18,3	34,6
81		0,35186	13,0	34,5
243		0,24690	9,1	34,3
3	25V12	0,92182	34,6	34,6
9		0,74313	27,8	37,7
27		0,54448	20,3	38,1
81		0,38685	14,4	38,0
243		0,28009	10,3	38,1
3	25V13	0,89094	33,4	33,4
9		0,65241	24,4	33,9
27		0,47607	17,7	34,2
81		0,36803	13,7	35,2
243		0,23016	8,5	33,9

Tab. 11 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci do vody

Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (μg/ml)	c <sub>k</sub> (μg/ml)
3	25V21	1,17880	44,3	44,3
9		0,90097	33,8	46,4
27		0,67665	25,3	47,6
81		0,50408	18,8	48,3
243		0,34493	12,8	47,7
3	25V22	0,91340	29,5	39,3
9		0,78853	27,2	45,5
27		0,72810	22,3	48,3
81		0,59662	16,1	48,5
243		0,43267	29,5	39,3
3	25V23	1,29205	48,5	48,5
9		0,98472	36,9	50,8
27		0,70234	26,3	50,7
81		0,51316	19,1	51,1
243		0,37636	14,0	51,4

Tab. 12 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (µg/ml)	c <sub>k</sub> (µg/ml)
3	25F11	0,70759	27,6	27,6
9		0,52133	20,4	28,3
27		0,50858	19,9	33,6
81		0,55762	21,8	41,2
243		0,55427	21,7	47,3
3	25F12	0,60592	23,7	23,7
9		0,45416	17,8	24,6
27		0,46474	18,2	30,1
81		0,42491	16,7	33,7
243		0,45608	17,9	39,7
3	25F13	0,42018	16,5	16,5
9		0,32621	12,9	17,6
27		0,23880	9,5	17,9
81		0,32864	13,0	24,1
243		0,32741	12,9	27,7

Tab. 13 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci do fosfátového pufru

Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (µg/ml)	c <sub>k</sub> (µg/ml)
3	25F21	0,77926	30,4	30,4
9		0,57607	22,5	31,2
27		0,59255	23,1	38,3
81		0,55771	21,8	43,5
243		0,51520	20,2	48,1
3	25F22	0,89265	34,7	34,7
9		0,68388	26,7	36,6
27		0,59928	23,4	41,0
81		0,51797	20,3	44,5
243		0,45565	17,9	47,9
3	25F23	0,69109	27,0	27,0
9		0,49638	19,4	27,1
27		0,71820	28,0	41,3
81		0,59393	23,2	44,5
243		0,51018	20,0	47,9

Tab. 14 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci s dialyzační membránou do vody

Čas	Vzorek	$A_k$	c (µg/ml)	$c_k$ (µg/ml)
3	DM25V11	-0,00290	-0,3	-0,3
9		0,08575	3,0	2,9
27		0,25275	9,3	10,1
81		0,93116	34,9	38,3
243		0,97058	36,4	49,8
3	DM25V12	0,11075	3,9	3,9
9		0,26029	9,6	10,7
27		0,58614	21,9	25,8
81		0,86986	32,6	42,7
243		0,88007	33,0	52,4

Tab. 15 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci s dialyzační membránou do vody

Čas	Vzorek	$A_k$	c (µg/ml)	$c_k$ (µg/ml)
3	DM25V21	0,04690	1,5	1,5
9		0,20196	7,4	7,8
27		0,43816	16,3	18,9
81		0,71744	26,8	34,1
243		0,66613	24,9	39,8
3	DM25V22	-0,00164	-0,3	-0,3
9		0,06083	2,1	2,0
27		0,41657	15,5	16,0
81		0,74746	28,0	32,9
243		0,69147	25,9	38,8

Tab. 16 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci s dialyzační membránou do fosfátového pufru

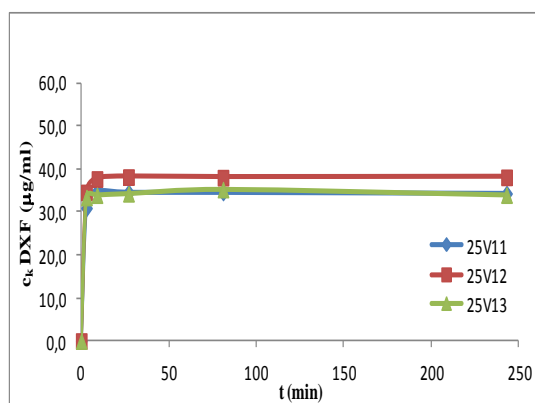
Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (µg/ml)	c <sub>k</sub> (µg/ml)
3	DM25F11	0,07250	3,1	3,1
9		0,23585	9,4	10,3
27		0,58458	22,8	26,4
81		0,81120	31,6	41,7
243		0,70695	27,6	46,7
3	DM25F12	-0,00190	0,2	0,2
9		0,08213	3,5	3,5
27		0,04089	1,9	2,9
81		0,61659	24,1	25,7
243		0,94265	36,7	45,1

Tab. 17 Koncentrace DXF uvolněného při stacionární disoluci s dialyzační membránou do fosfátového pufru

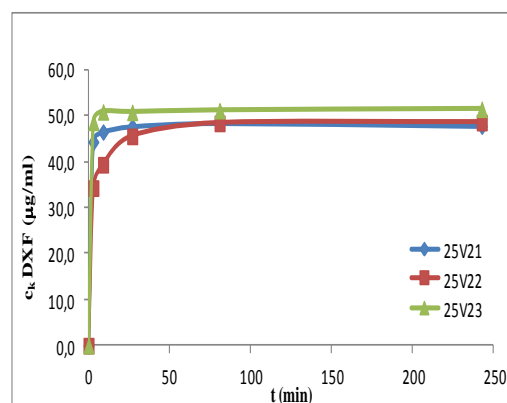
Čas	Vzorek	A <sub>k</sub>	c (µg/ml)	c <sub>k</sub> (µg/ml)
3	DM25F21	0,01950	1,0	1,0
9		0,04451	2,0	2,3
27		0,19817	7,9	8,8
81		0,65175	25,4	28,6
243		0,83133	32,4	42,8
3	DM25F22	0,01726	1,0	1,0
9		0,05361	2,4	2,6
27		0,16362	6,6	7,5
81		0,29956	11,8	14,7
243		0,57618	22,5	28,7

Tab. 18 Navážky vzorků v gramech

Vzorek	1	2	3
25V1	0,0201	0,0204	0,0203
25V2	0,0196	0,0196	0,0204
25F1	0,0210	0,0201	0,0201
25F2	0,0202	0,0204	0,0199
DM25V1	0,0201	0,0204	-
DM25V2	0,0174	0,0173	-
DM25F1	0,0198	0,0199	-
DM25F2	0,0172	0,0177	-

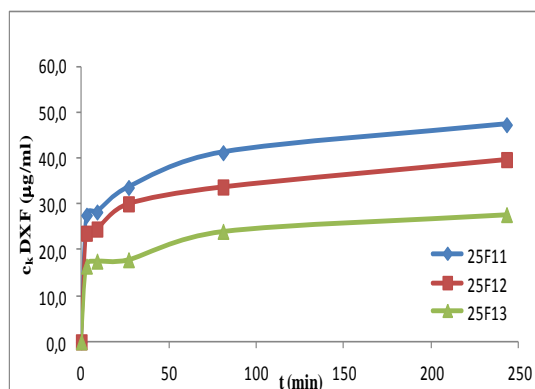


a) 25V1

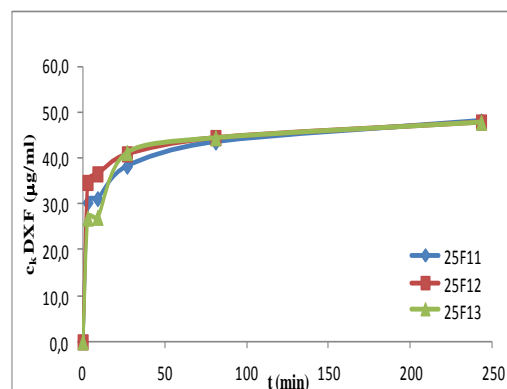


b) 25V2

Obr. 16 Průběh stacionární disoluce ve vodě



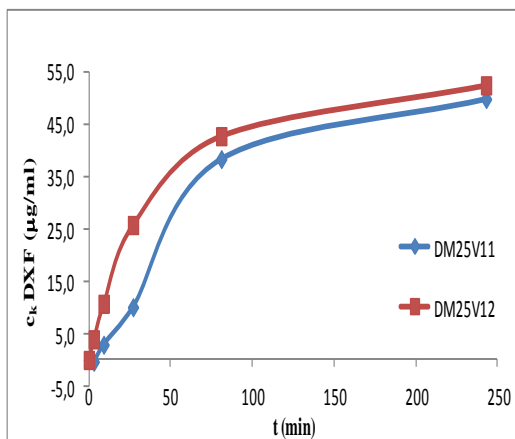
a) 25F1



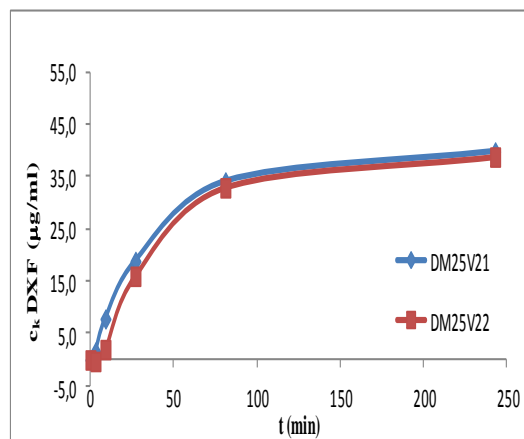
b) 25F2

Obr. 17 Průběh stacionární disoluce ve fosfátovém pufru



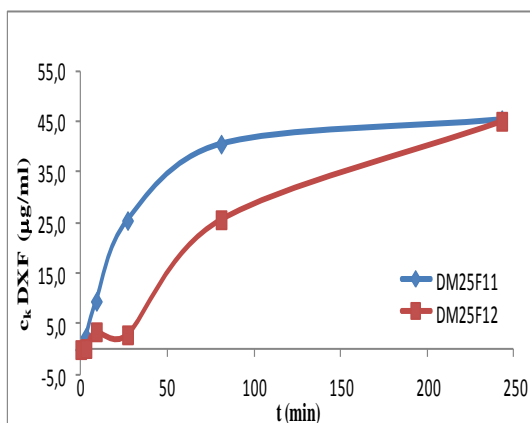


a) DM25V1

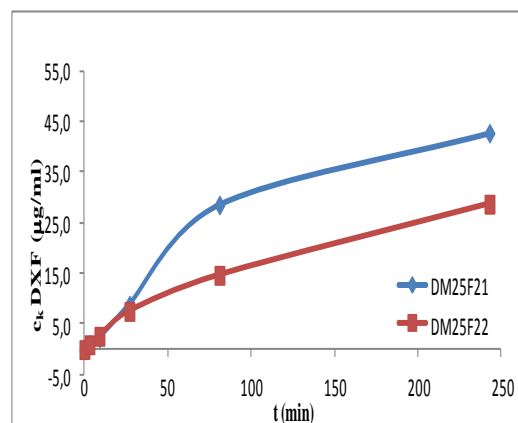


b) DM25V2

Obr. 18 Průběh stacionární disoluce s dialyzační membránou ve vodě

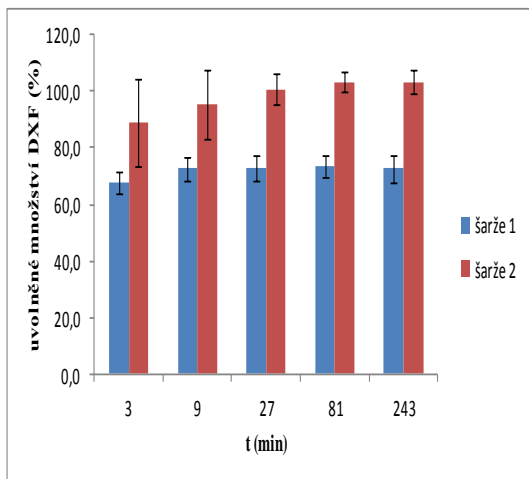


a) DM25F1

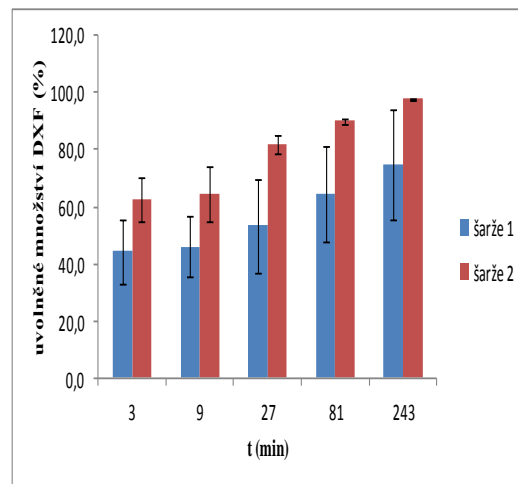


b) DM25F2

Obr. 19 Průběh stacionární disoluce s dialyzační membránou ve fosfátovém pufru

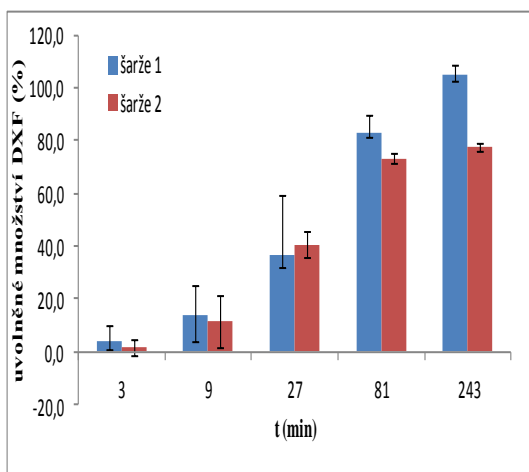


a) 25V

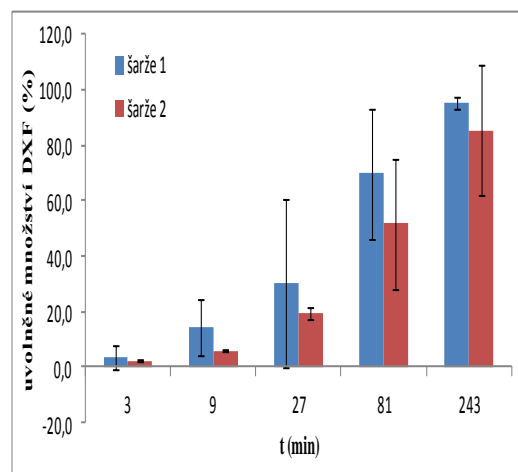


b) 25F

Obr. 20 Závislost uvolněného množství DXF (%) na použitém disolučním mediu



a) DM25V

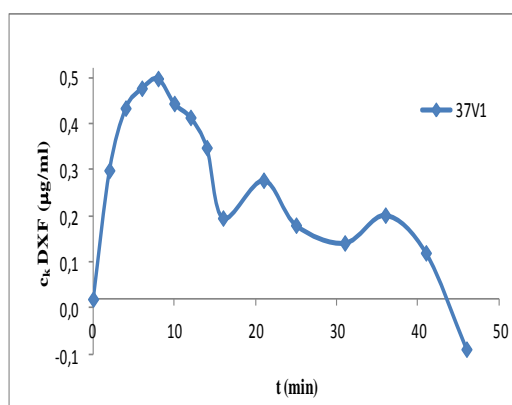


b) DM25F

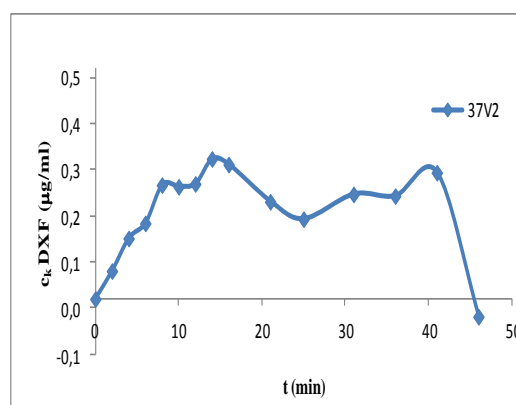
Obr. 21 Závislost uvolněného množství DXF (%) na použitém disolučním mediu při použití dialyzační membrány

Tab. 19 Výsledky hodnocení analýzy rozptylu (Anova) mezi šaržemi a disolučním mediem pro stacionární disoluci

Zdroj variability	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Střední čtverec	F	P hodnota	F <sub>krit</sub>
Médium	1469,36	1	1469,36	12,9	0,00241	4,494
Šarže	3021,30	1	3021,30	26,6	0,00010	4,494
Interakce	18,50	1	18,50	0,16	0,69175	4,494
Mezi	1815,92	16	113,49			
Celkem	6325,08	19				

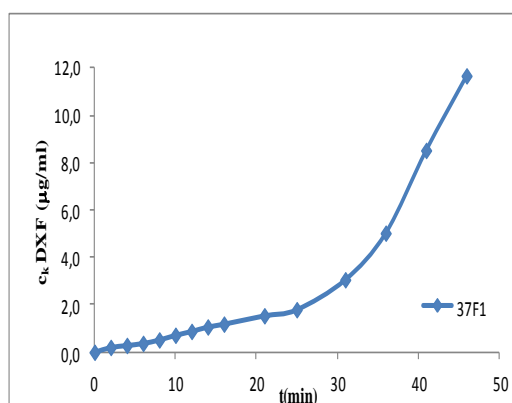


a) 37V1

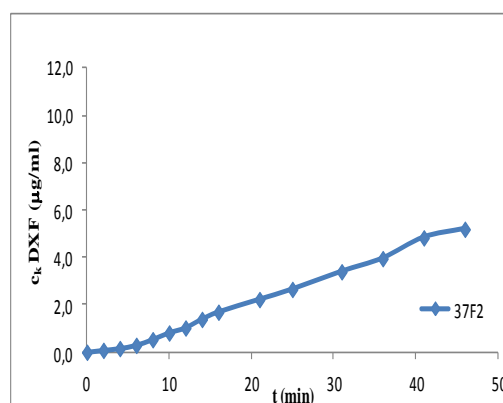


b) 37V2

Obr. 22 Průběh průtokové disoluce ve vodě

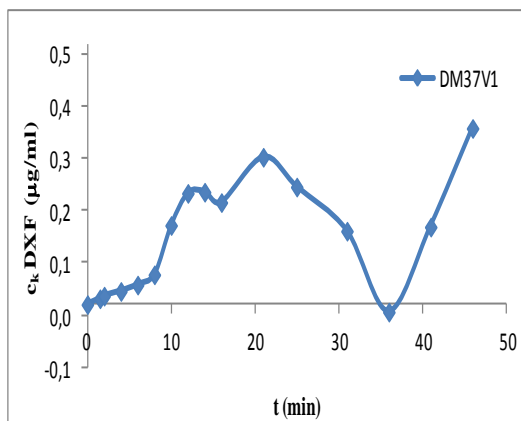


a) 37F1

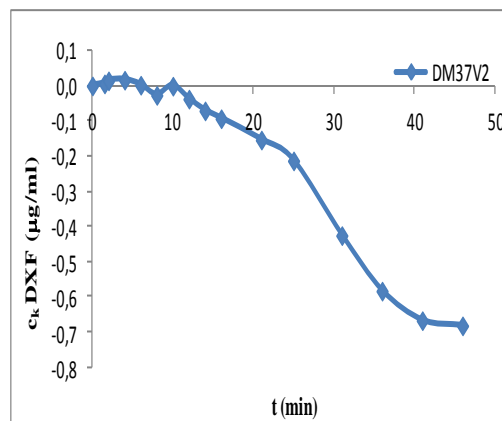


b) 37F2

Obr. 23 Průběh průtokové disoluce ve fosfátovém pufru

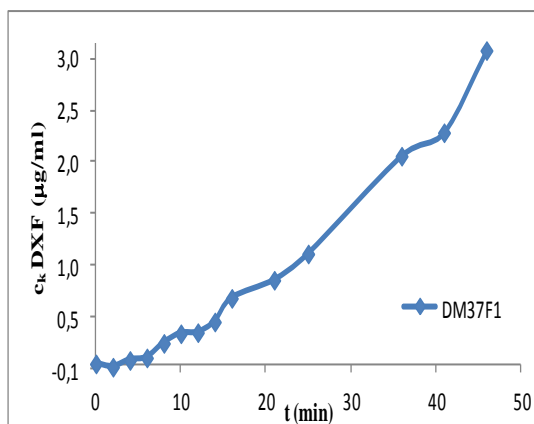


a) DM37V1

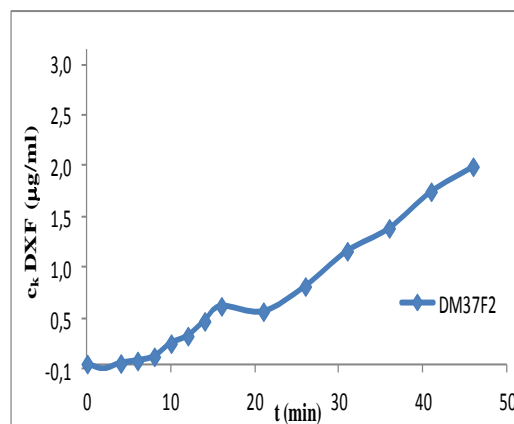


b) DM37V2

Obr. 24 Průběh průtokové disoluce s dialyzační membránou ve vodě



a) DM37F1



b) DM37F2

Obr. 25 Průběh průtokové disoluce s dialyzační membránou ve fosfátovém pufru

## 9 Diskuse

Disoluce je základní metodou hodnocení uvolňování léčivé látky z lékové formy.<sup>3</sup>

Při vývoji metodiky disoluce je nezbytné stanovit její přesné podmínky, jako jsou

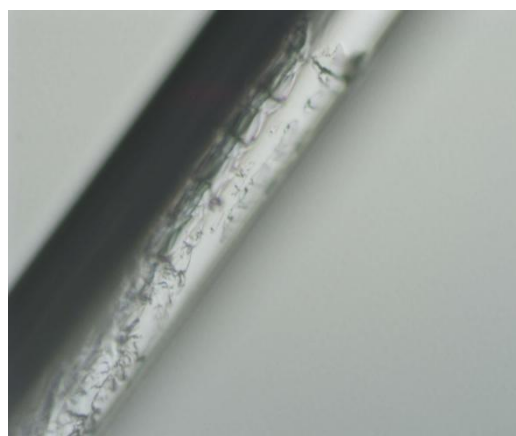
- použitý přístroj, v případě použití přístroje s průtokovou celou, jaká průtoková cela se použije
- složení, objem a teplota disolučního média
- rychlost otáček míchacího zařízení nebo průtoková rychlost disolučního média
- doba, metoda a množství pro vzorkování zkoušeného roztoku nebo podmínky průběžného sledování
- metoda analýzy.<sup>8</sup>

Medikované mikrovláknenné nosiče jsou slibným materiálem pro transport léčivých látek do poškozených tkání.<sup>29</sup> Cílem této diplomové práce byl vývoj metodiky disoluce pro mikrovláknenné nosiče léčiv na bázi derivátů hyaluronanu.

Při výrobě je léčivo nanášeno na již hotové hyaluronové mikrovláknno. Pokud je léčivo uloženo v jedné vrstvě, je tato vrstva velmi tenká a je tudíž předpoklad velmi rychlého uvolnění léčiva. Na Obr. 26 je zachycen mikroskopický snímek povrchu vlákna. Obrázek *a* ilustruje část s celistvou vrstvou naneseného léčiva, zatímco na obrázku *b* je vlákno, jehož povrch vykazuje známky porušenosti. Při namátkovém výběru a kontrole vzorku vlákna však takových míst byl nalezen jen malý počet.



a) Nepoškozené mikrovláknno



b) Poškozené mikrovláknno

Obr. 26 Povrch analyzovaného mikrovláknna pod mikroskopem, zvětšení 400x

Je obtížné určit zda nedokonalost povrchu byla způsobena přímo ve výrobním procesu nebo k ní může docházet při následné manipulaci s vláknem. Abych se poškození vrstvy vyhnula, veškeré manipulace s vláknem jsem prováděla opatrně za použití latexových chirurgických rukavic.

Pro disoluční pokusy jsem použila vždy cca 0,02 g mikrovlákná naváženého s přesností 0,1 mg. Vzhledem k tomu, že při předběžných pokusech bylo po vložení vlákna v neuspořádané formě do lahvičky, ve které probíhal pokus, a následném přidání modelového média, problematické odebrat vzorek media, aniž by docházelo k zachycení mikrovlákná na špičku mikropipety nebo k jeho nasátí do špičky, snažila jsem se z vlákna vytvořit stabilní smotek (Obr. 27).



Takový smotek vlákna byl následně standardně používán pro testování podmínek stacionární disoluce i průtokové disoluce s využitím minicely.

Stejným způsobem bylo navažováno i vlákno bez léčiva, které sloužilo jako slepý vzorek.

Obr. 27 Smotek mikrovlákná

Jako disoluční médium jsem použila čistou vodu a izotonický fosfátový pufr pH 7,4 (IPB). Voda byla jako médium vybrána z důvodu očekávaného maximálního koncentračního spádu. Protože cílem disolučního pokusu bylo vyvinout vhodnou metodu pro mikrovlákná, studovala jsem jednak přímé uvolnění z vlákna do media a jednak uvolnění z vlákna uzavřeného v dialyzační membráně. Byla použita dialyzační membrána Spectra/Por Dialysis Membrane trubicovitého tvaru s velikostí pórů 6-8000 Da. Dialyzační membrána částečně imituje transport léčiva přes membrány za podmínek podobných lidskému organismu, především při průtokové disoluci.

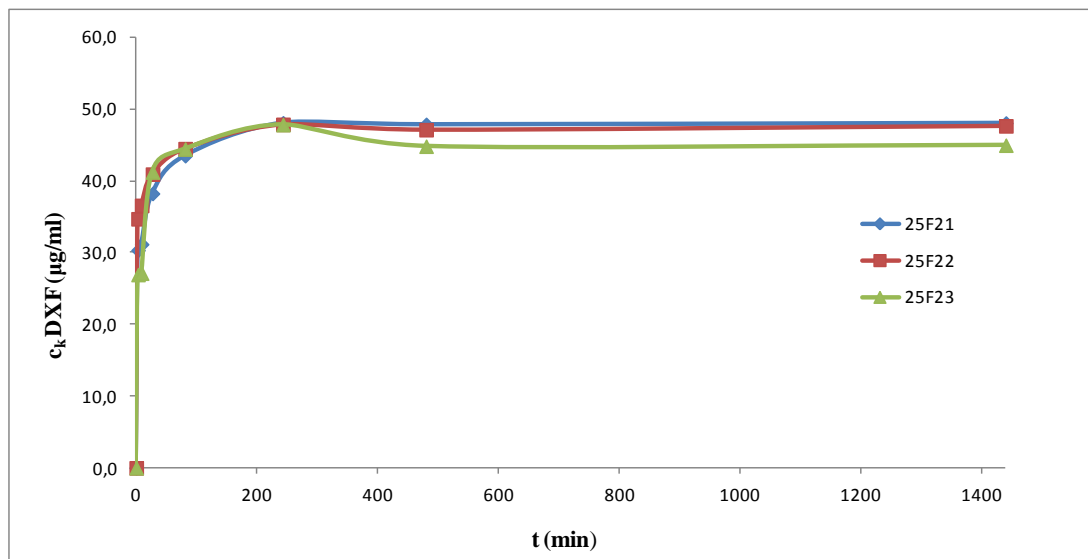
K ověření celkového množství léčiva fixovaného na mikrovlákně jsem použila navážku vlákna (cca 0,02 g), kterou jsem vložila do lahvičky a zalila 10 ml čistou vodu nebo IPB pH 7,4. V čase 24 hod a 48 hod jsem odebrala 2 ml media

ke stanovení obsahu DXF. Výsledky uvedené v Tab. 20 potvrzují, že v 1 g vlákna je obsaženo 17 mg DXF. Z tohoto zjištění se vycházelo při dalším zpracování výsledků.

Tab. 20

	navážka vlákna (g)	c teor (mg/ml)	A 24h	c 24 (mg/ml)	24h %
<b>Voda</b>	0,0184	0,0313	0,730	0,027	<b>87,4</b>
<b>IPB</b>	0,0175	0,0298	0,793	0,031	<b>103,9</b>
	navážka vlákna (g)	c teor (mg/ml)	A 48h	c 48 (mg/ml)	48h %
<b>Voda</b>	0,0184	0,0313	0,827	0,031	<b>99,0</b>
<b>IPB</b>	0,0175	0,0298	0,717	0,028	<b>94,0</b>

Při vývoji disoluční metody bylo v předpokusech vlákno vyluhováno po dobu 24 hodin a bylo sledováno množství uvolněného léčiva. Jak ilustruje Obr. 28, koncentrace se po 4 hodinách již dále nezvyšovala. Vzhledem k teoretické koncentraci léčiva cca 50 µg/ml se jednalo o dosažení maximální koncentrace. Proto byly časové intervaly odběru vzorků soustředěny na rozmezí do 4 hodin, jak bude diskutováno dále.



Obr. 28 Množství uvolněného léčiva po dobu 24 hodin

## 9.1 Stacionární disoluce

Navažování vlákna probíhalo přímo do lahvičky, ve které následně probíhal pokus stacionární disoluce. Smotek po přidání média, jak ilustruje Obr. 29, okamžitě nabobtnal a již od počátku udržoval stejný tvar a tvořil tak pouze malý útvar, který se s rostoucím časem dále zmenšoval.



Obr. 29 Standardní smotek vlákna v lahvičce po přidáním média při stacionární disoluci

Stacionární disoluce probíhala při teplotě  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Vzhledem k výsledkům prvotních pokusů, kdy se většina léčiva velmi rychle uvolnila, byly vzorky odebrány v časech 3, 9, 27, 81 a 243 min. Po každém odběru vzorku byl doplněn stejný objem média, aby celkové množství média zůstávalo po celou dobu disoluce stejné. Doplnování čistého média bylo zohledněno ve výpočtech.

Průběh stacionární disoluce pro vodu je znázorněn na Obr. 16. K pokusu byly použity 3 paralelní vzorky dvou šarží vlákna, označené jako 25V11-13 (obr. a) a jako 25V21-23 (obr. b). Výsledky experimentálních pokusů ukazují, že prakticky celé množství se z mikrovlákn ve vodném prostředí uvolní během velmi krátké doby 3 – 9 minut. Porovnáním obr. 16a a 16b jsou patrné rozdíly mezi šaržemi.

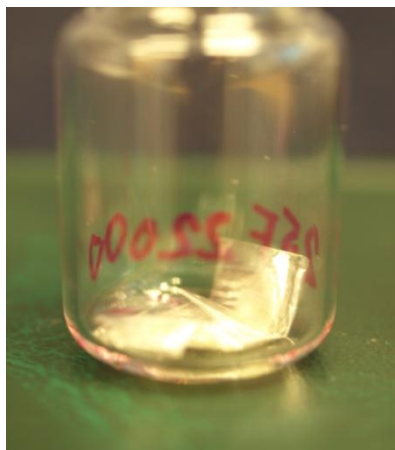
Na Obr. 17 jsou analogicky pro 3 paralelní vzorky dvou šarží vlákna, označené jako 25F11-13 (obr. a) a jako 25F21-23 (obr. b), prezentovány výsledky pro IPB. Je zřejmé, že po počátečním rychlém uvolnění části DXF během 3 minut následuje pomalejší uvolňování a celkové množství DXF se uvolní až po cca 4 hodinách (243 minut). Disoluce v prostředí fosfátového pufru pH 7,4 je ovlivněna přítomností iontů v roztoku, které snižují koncentrační spád.<sup>34</sup>



Na Obr. 17a jsou patrné rozdíly v dosažené maximální koncentraci u použitých paralelních vzorků, které lze v této pilotní disoluční studii jen obtížně komentovat, neboť u ostatních pokusů nebyly zaznamenány. Lze uvažovat o poškození části povrchové vrstvy s léčivem, jak naznačuje mikroskopický snímek na Obr. 26 b), ale mikroskopický snímek je náhodný nález na určité části mikrovlákná; povrch vlákna před pokusem nebyl systematicky zkoumán.

V tab 19 jsou prezentovány výsledky analýzy rozptylu (Anova) pro hodnocení významnosti rozdílů mezi šaržemi a disolučními médii. Pro oba posuzované faktory byly rozdíly významné ( $p \geq 0,99$ ).

Pro pokus s dialyzační membránou byla navážka mikrovlákná ve standardním smotku vložena do membrány a následně umístěna na dno lahvičky, ve které bylo vlákno podrobena disolučnímu testování (Obr. 30).



Obr. 30 Umístění navážky mikrovlákná v dialyzační membráně

Průběh stacionární disoluce do vody přes dialyzační membránu znázorňuje Obr. 18. Byly použity 2 paralelní vzorky mikrovlákná ve dvou šaržích označené jako DM25V11-12 (Obr. 18 a) a jako DM25V21-22 (Obr. 18 b). Na Obr. 19 je obdobně zachyceno uvolňování DXF ze 2 paralelních vzorků 2 šarží mikrovlákná v prostředí IPB. Vzorky jsou označené jako DM25F11-12 (Obr. 19a) a jako DM25F21-22 (Obr. 19b). Z výsledků provedených pokusů je zřejmé, že DXF se z mikrovlákná uvolňuje pomaleji, což je evidentní především při disoluci do vody porovnáním Obr. 16 a 18. Vzhledem k vysoké variabilitě experimentálních výsledků však nebylo možné významnost rozdílů mezi dílčími faktory (médium, šarže) při disoluci s použitím DM prokázat statisticky.

Rozdíly v disoluci léčiva mezi šaržemi i mezi jednotlivými vzorky stejné šarže jsou v pilotní studii obtížně vysvětlitelné. Dá se předpokládat, že rozdíly mohou být způsobeny nestejnoměrným nanesením povrchové vrstvy s léčivem, odchylkami v technologickém postupu při nanášení vrstvy u šarží 1 a 2 nebo pozdějším poškozením této vrstvy. Kromě úvahy o vlivu procesu rozdělování přes membránu na zpomalení nárůstu koncentrace léčiva v disolučním médiu se nabízí také úvaha o možnosti, že část DXF je při rozpadu vlákna navázaná na fragmenty s větší molekulovou hmotností než membrána zprvu propustí a zůstává uzavřená v membráně. Výsledky vyžadují další upřesnění.

Přehledné porovnání průběhu v uvolňování DXF při stacionární disoluci ve vodě nebo IPB umožňují obrázky 20 a 21. V nich jsou vyznačeny průměrné hodnoty kumulativního množství uvolněného DXF (%) (Tab. 10-17) vypočítaných s ohledem na navážky vlákna uvedené v Tab. 18. Množství léčiva bylo experimentálně ověřeno v pokusu, který je prezentován v Tab. 20. Vzorky byly odebrány po 48 h a bylo stanoveno množství DXF, které odpovídalo teoretickému množství vzhledem k navážce vlákna.

Závislost průměrného uvolněného množství DXF (%) ze dvou jednotlivých šarží vlákenného nosiče na použitém disolučním médiu při stacionární disoluci bez použití dialyzační membrány znázorňuje Obr. 20 a (voda) a 20 b (IPB). Z obrázku je patrný rozdíl mezi jednotlivými šaržemi i již komentovaný rozdíl v disolučním médiu. Podobně je na Obr. 21 porovnána závislost uvolněného množství DXF (%) na použitém disolučním médiu při použití dialyzační membrány. Je evidentní, že rychlost uvolňování je v porovnání s pokusem bez DM značně snížena. Vysoká variabilita, především při disoluci do IPB, je dána rozdílným průběhem uvolňování ze dvou použitých vzorků vlákna (Obr. 19). Detailní vysvětlení není v této pilotní studii zatím možné, hodnocení by vyžadovalo další měření, které s ohledem na omezené množství vzorku prozatím nebylo možné realizovat.

## **9.2 Otevřená průtoková disoluce**

S využitím disoluční minicely bylo uvolňování DXF z mikrovlákn studováno také za podmínek otevřené průtokové disoluce při 37°C. Při ní je ke vzorku přiváděno stále nové, čisté medium a koncentrační spád by měl být maximální. Důležitým

parametrem je rychlost průtoku média. Určitou nevýhodou je velká spotřeba průtokového média. Pokus byl uskutečněn s jedním vzorkem od každé šarže, značené 1 a 2 (poslední číslo v kódu na obrázcích 22–25) po dobu 46 minut při průtoku média 10 ml/min. V analogii průběhu stacionární disoluce z mikrovlákn byla vzorky umístěny vždy přímo mezi skleněné kuličky naplněné v dialyzační jednotce. Provedení ukazuje Obr. 15, výsledky jsou ilustrovány na Obr. 22 a 23. Podobně jako v případě stacionární disoluce byla průtoková disoluce realizována také s dialyzační membránou. Umístění mikrovlákn v minicele a následně v dialyzační jednotce je zachyceno na Obr. 14, výsledky jsou ilustrovány na Obr. 24 a 25.

Postupný trend zvyšování kumulativní koncentrace DXF ( $c_k$ ) je patrný při použití IPB u vzorků bez membrány i s membránou (Obr. 10 a 12), na rozdíl od vody, kde po počátečním nárůstu koncentrace dochází k poklesu a u vzorku DM37V2 byly dokonce zaznamenány záporné hodnoty (Obr. 22 a 24). Důvody tohoto chování nejsou v této fázi disolučních testů zcela zřejmé. Celkové množství léčiva uvolněného průtokovou metodou do disolučního media je významně nižší než u stacionární disoluce. Vzhledem k omezenému množství mikrovlákn a celkové časové náročnosti experimentu nebylo v této fázi možné pokus opakovat.

Je zcela jisté, že průtoková disoluce s průběhem stacionární disoluce nijak nekoreluje a vyžaduje další studium a optimalizaci podmínek včetně prodloužení doby pokusu s monitoringem průběhu uvolňování většiny léčiva.

## 10 Závěry

Z výsledků této experimentální diplomové práce vyplynuly následující závěry:

- 1) Pro snadnější manipulaci s mikrovláknem během navažování a odběru vzorků je vhodné vytvořit malý kompaktní smotek.
- 2) Uvolňování dexamethasonu do vody je při stacionární disoluci bez dialyzační membrány velmi rychlé, v intervalu do 9 minut se uvolní prakticky veškeré množství léčiva fixovaného v povrchové vrstvě. Při použití izotonického fosfátového pufru se rychlost uvolňování zpomaluje.
- 3) Při stacionární disoluci bez dialyzační membrány byl zjištěn významný rozdíl mezi použitými disolučními médii a šaržemi vlákna ( $p \geq 0,99$ )
- 4) Použití dialyzační membrány ve srovnání s disolucí bez dialyzační membrány zpomaluje průběh stacionární disoluce, což bylo markantní především ve vodě.
- 5) V orientačním pokusu nebyla zjištěna korelace mezi uvolňováním léčiva za podmínek stacionární a otevřené průtokové disoluce.
- 6) Vzhledem k omezenému množství mikrovláknů a časové náročnosti nebylo možné pokus otevřené průtokové disoluce opakovat. V budoucnu si vyžádá upřesnění s optimalizací podmínek.

## 11 Použitá literatura

---

- <sup>1</sup> VELEBNÝ, V.: Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství, Teze habilitační práce. 2012. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno, 29 s.
- <sup>2</sup> UDDIN, R., SAFFOON, N., SUTHRADAR, K. B.: Dissolution and dissolution apparatus: a review. *Int. J. Cur. Biomed. Pharm. Res.*, 2011, 1(4), s. 201 -207. ISSN 2231-6264.
- <sup>3</sup> DVOŘÁČKOVÁ, K., BAUTZOVÁ, T., RABIŠKOVÁ, M.: Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chem. Listy*, 2011, 105 (1), s 50-54. ISSN 1213-7103.
- <sup>4</sup> JOSHI, A., PUND, S., NIVSARKAR, M., VASU, K., SHISHOO, C.: Dissolution test for site-specific release isomiazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocatingcylinder): optimization using response surface methodology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 69 (2), s. 769–775. ISSN 0939-6411.
- <sup>5</sup> SIEWERT, M., DRESSMAN, J., BROWN, C. K., SHAH, V. P.: FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *Pharm. Sci. Tech.*, 2003, 4 (1), s 43-52. ISSN 1530-9932.
- <sup>6</sup> FIP: Guidelines for dissolution testing of solid oral products. *Dissolut. Technol.*, 1997; 4 (4), s 5-14. ISSN 1521-298X.
- <sup>7</sup> Sotax, k 13.2.2014.  
<http://www.teknokroma.es/UserFiles/Generadores/Sotax%20CE%207smart%20applications.pdf>
- <sup>8</sup> Český Lékopis 2009 - Doplněk 2013. 2013, Grada Publishing, a. s., Praha, 4354 s., CD-ROM, Metody farmaceutické technologie, s 338-426.
- <sup>9</sup> Farmaceutická fakulta – přednášky z farmaceutické technologie, k 7.5.2014.  
<https://docs.faf.cuni.cz/KFT/?path=farmaceuticka+technologie>
- <sup>10</sup> NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinární Medicína*, 2008, 53 (8), s 397–411. ISSN 0375-8427.

- 
- <sup>11</sup> KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.*, 2007; 29 (1), s 17–25. ISSN 1573-6776.
- <sup>12</sup> CHONG, F. B., BLANK, L.M., McLAAUGHLIN, R., NIELSEN, L.K.: Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 66 (4), s 341–351. ISSN 1432-0614.
- <sup>13</sup> LONG, L., YANFENG, L., JIANGHUA, L., GUOCHENG, D., JIAN, CH.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10 (1), s. 99-107. ISSN 1475-2859.
- <sup>14</sup> CHIEN, L.J., LEE, C.K.: Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnol. Prog.*, 2007; 23 (5), 1017–1022. ISSN 1520-6033.
- <sup>15</sup> CHIEN, L.J., LEE, C.K.: Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 77 (2), s. 339–346. ISSN 1432-0614.
- <sup>16</sup> MAO, Z., CHEN, R.R.: Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol. Prog.*, 2007, 23 (5), s. 1038–1042. ISSN 1520-6033.
- <sup>17</sup> YU, H.M., STEPHANOPOULOS, G.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic. Eng.*, 2008, 10 (1), s. 24–32. ISSN 1096-7176.
- <sup>18</sup> GARG, H. G., HALES, CH. A.: Chemistry and biology of hyaluronan, 2004, Elsevier Ltd., Oxford, 605 s., ISBN 0-08-044382-6. SHU, X. Z., PRESTWICH, G. D.: Therapeutic biomaterials from chemically modified hyaluronan, s. 475-504.
- <sup>19</sup> BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C.: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 2010, 28 (3), s. 325-347. ISSN 0734-9750.
- <sup>20</sup> DOSHI, J., RENEKER, D. H.: Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 1995, 35 (2-3), s. 151-160. ISSN 0304-3886.

- 
- <sup>21</sup> LEBEDOVÁ, V.: Studium nasákavosti nanovláken připravených z derivátů hyaluronanu. Diplomová práce. 2013. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 69 s.
- <sup>22</sup> *Electrospinning*, k 7.5.2014.  
<http://www.che.vt.edu/Faculty/Wilkes/GLW/electrospinning/electrospinning.html>
- <sup>23</sup> KSV NIMA, k 6.5.2014. <http://www.ksvnima.com/technologies/dip-coating>
- <sup>24</sup> YTC America inc., k 6.5.2014. [http://www.ytca.com/dip\\_coating](http://www.ytca.com/dip_coating)
- <sup>25</sup> SHEN, A. Q., GLEASON, B., MCKINLEY, G. H., STONE, H. A.: Fiber coating with surfactant solutions. *Physics of Fluids*, 2002, 14 (11), s 4055-4068. ISSN 1089-7666.
- <sup>26</sup> FAUSTINI, M., LOUIS, B., ALBOUY, P. A., KUEMMEL, M., GROSSO, D.: Preparation of sol-gel films by dip-coating in extreme conditions. *J. Phys. Chem. C.*, 2010, 114 (17), s 7637-7645. ISSN 1932-7447.
- <sup>27</sup> ULMAN, A., MARK, H. F.: Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.*, 1996, 96 (4), s 1533-1554. ISSN 1520-6890.
- <sup>28</sup> BRINKER, C. J., FRYE, G. C., HURD, A. J., ASHLEY, C. S.: Preparation and characterization fundamentals of sol-gel dip-coating. *Thin Solid Films*, 1991, 201 (1), s 97-108. ISSN 0040-6090.
- <sup>29</sup> Contipro pharma, k 11.3.2014. <http://www.contipro.cz/produkty/farmaceuticke-suroviny/ha-ve-farmacii>
- <sup>30</sup> Český Lékopis 2009 - Doplněk 2013. 2013, Grada Publishing, a. s., Praha, 4354 s., CD-ROM, Dexamethasoni natrii phosphas, s. 2291-2294.
- <sup>31</sup> MAREK, J.: Léčba kortikoidy – doporučené postupy pro praktické lékaře, k 6.5.2014. <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
- <sup>32</sup> MLYNÁŘ, P., ŠRÁMEK, D., MLYNÁŘOVÁ, M.: Dexamethason v současné terapii. *FarmiNews*, 2010, 7 (3), s. 8-9. ISSN 1213-1717.
- <sup>33</sup> WHO - Model list of essential medicines, k 7.5.2014.  
<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>
- <sup>34</sup> LINCOVÁ, D., FARGHALI, H.: Základní a aplikovaná farmakologie. 2002, Galén, Praha, 601 s., ISBN 80-7262-168-8.